

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 1913

THÈSE **242**

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

LES MICROBES INVISIBLES

PAR

Georges FONTANEL

Né à Vienne (Isère), le 7 octobre 1884

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Président : MONSIEUR ACHARD, PROFESSEUR

PARIS

IMPRIMERIE DES THÈSES DE MÉDECINE

OLLIER-HENRY

26, Rue Monsieur-le-Prince, 26, -- (VI^e Ar^t).

1913

242

THÈSE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 1913

THÈSE

N^o

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

LES MICROBES INVISIBLES

PAR

Georges FONTANEL

Né à Vienne (Isère), le 7 octobre 1884

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris



Président : MONSIEUR ACHARD, PROFESSEUR

PARIS

IMPRIMERIE DES THÈSES DE MÉDECINE
OLLIER-HENRY

26, Rue Monsieur-le-Prince, 26, == (VI^e Arr^t).

—
1913

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen		M. LANDOUZY
Professeurs		MM.
Anatomie		NICOLAS
Physiologie		CH. RICHET
Physique médicale		WEISS
Chimie organique et Chimie minérale		DESGREZ
Parasitologie et Histoire naturelle médicale		BLANCHARD
Pathologie et Thérapeutique générales		AGHARD
Pathologie médicale		VIDAL
Pathologie chirurgicale		TEISSIER
Anatomie pathologique		LEJARS
Histologie		PIERRE MARIE
Opérations et appareils		PRENANT
Pharmacologie et matière médicale		HARTMANN
Thérapeutique		POUCHET
Hygiène		MARFAN
Médecine légale		CHANTEMESSE
Histoire de la médecine et de la chirurgie		THOINOT
Pathologie expérimentale et comparée		LETULLE
		ROGER
Clinique médicale		CHAUFFARD
		DEBOVE
		GILBERT
Maladies des enfants		LANDOUZY
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale		HUTINEL
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		GILBERT BALLET
Clinique des maladies du système nerveux		GAUCHER
		DEJERINE
Clinique chirurgicale		PIERRE DELBET
		QUENU
		RECLUS
		X...
Clinique ophthalmologique		DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires		LEGUEU
		BAR
Clinique d'accouchements		PINARD
		RIBEMONT-DES-
		SAGNE
Clinique gynécologique		POZZI
Clinique chirurgicale infantile		KIRMISSON
Clinique thérapeutique		A. ROBIN

Agrévés en exercice

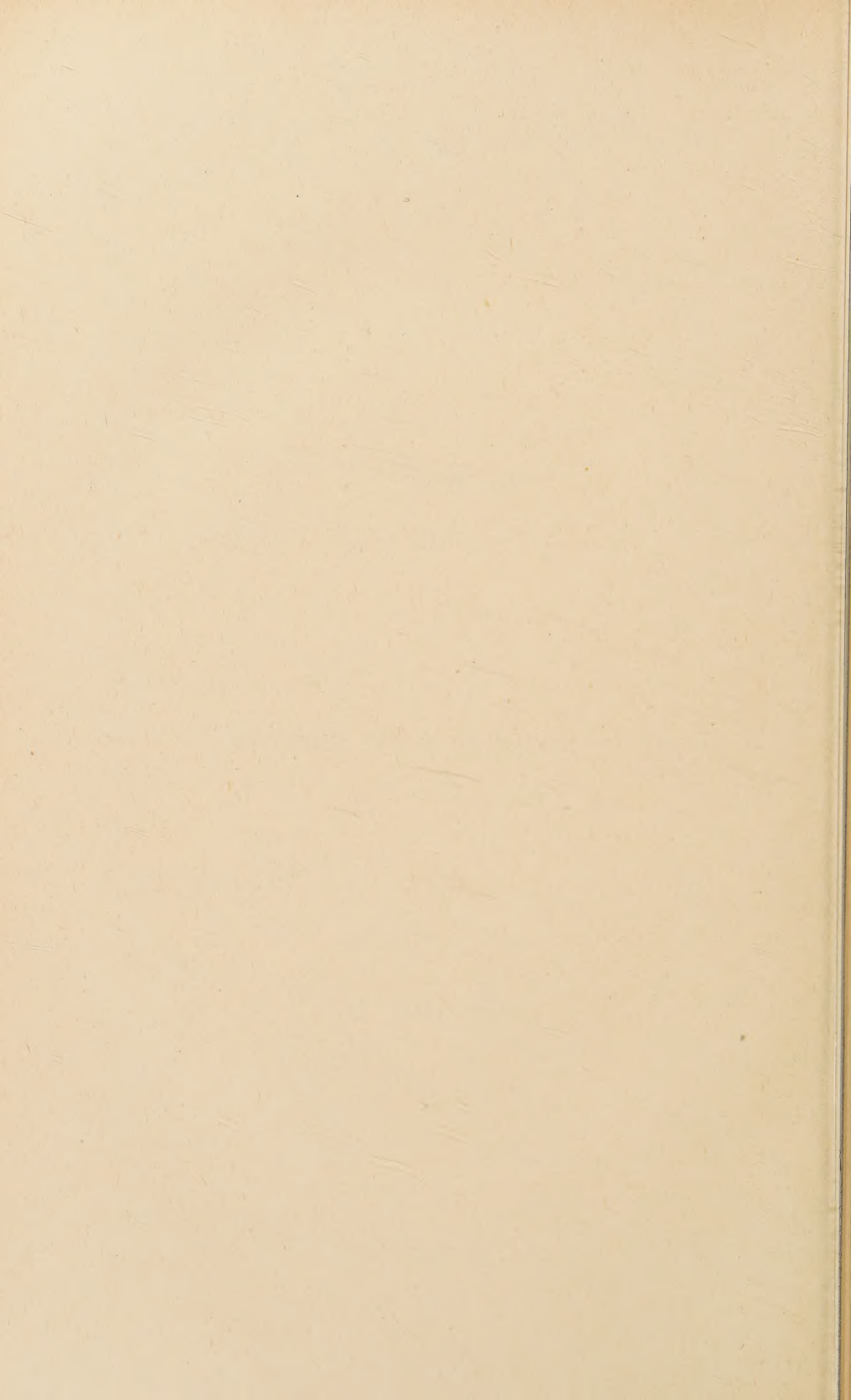
MM.			
BALTHAZARD	DUVAL PIERRE	LENORMANT	PROUST
BERNARD	GOUGEROT	LEQUEUX	RATHERY
BRANCA	GREGOIRE	LERI	RETTERER
BRINDEAU	GUENIOT	LOEPER	RICHAUD
BROCA ANDRÉ	GUILLAIN	MACAIGNE	ROUSSY
BRUMPT	JEANNIN	MAILLARD	BOUVIERE
CAMUS	JOUSSET ANDRÉ	MORESTIN	SCHWARTZ
CARNOT	LABBE MARGEL	MULON	SICARD
CASTAIGNE	LANGLOIS	NICLOUX	TERRIEN
CHEVASSU	LAIGNEL-LAVAS	NOBECOURT	TIFFENEAU
CLAUDE	TINE	OKINCZYC	ZIMMERN
COUVELAIRE	LECENE	OMBREDANNE	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MA MÈRE

A MA GRAND'MÈRE, A MES PARENTS

A MES AMIS

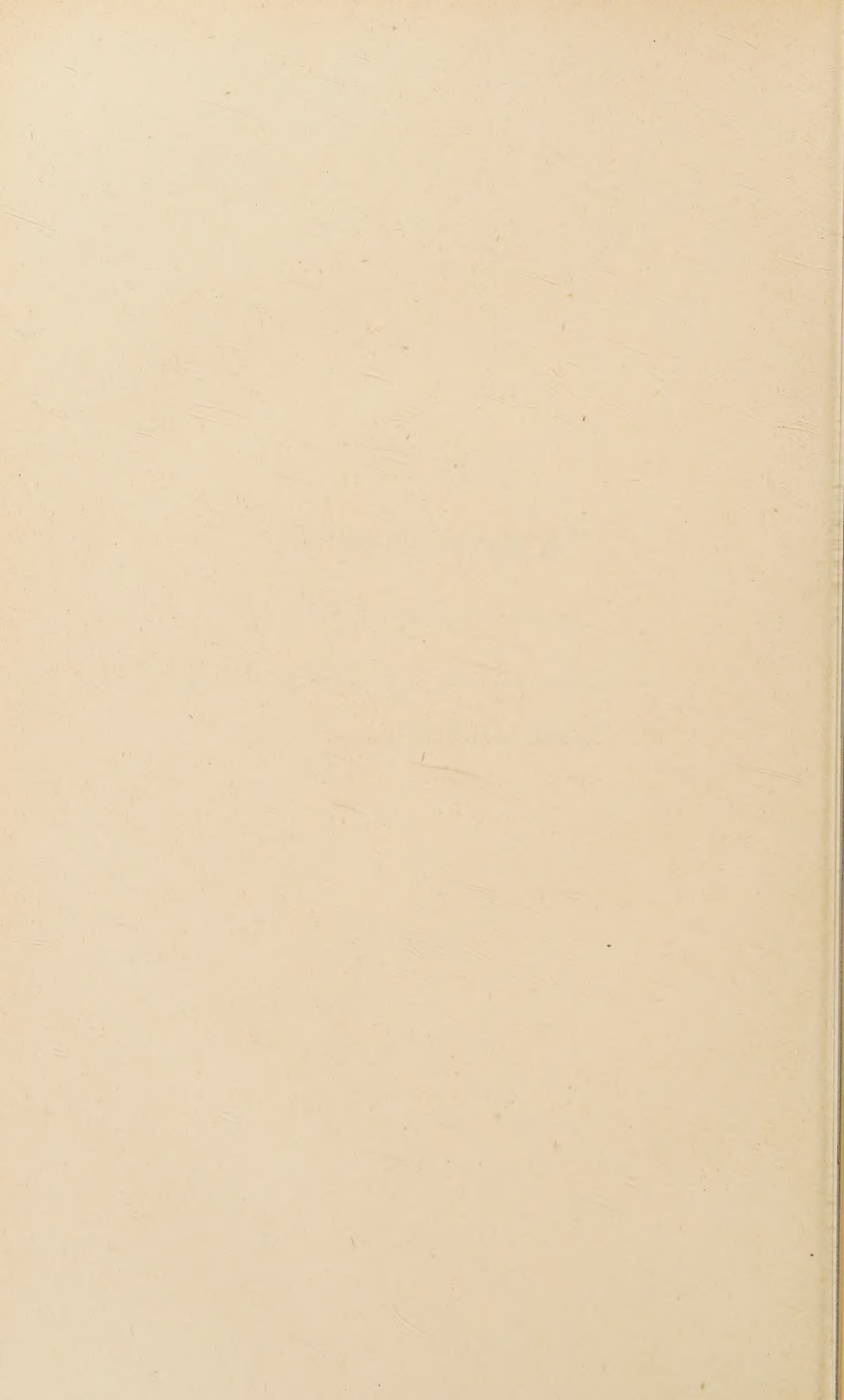


A MON CHER MAITRE

MONSIEUR LE DOCTEUR WURTZ

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE



A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ACHARD

PROFESSEUR DE PATHOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE GÉNÉRALES

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

MÉDECIN DE L'HOPITAL NECKER

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. DELBET

PROFESSEUR DE CLINIQUE CHIRURGICALE A LA FACULTÉ
DE MÉDECINE
CHIRURGIEN DE L'HÔPITAL NECKER

MONSIEUR LE DOCTEUR MANELAIRE

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
CHIRURGIEN DE LA CHARITÉ

MONSIEUR LE DOCTEUR BRAULT

MÉDECIN DE L'HÔPITAL LARIBOSIÈRE
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

MONSIEUR LE DOCTEUR VARIOT

MÉDECIN DE L'HOSPICE DES ENFANTS ASSISTÉS

AVANT-PROPOS

On sait qu'il existe actuellement malgré les récentes acquisitions de la science, un assez grand nombre de maladies, presque certainement microbiennes, et dont la nature est encore indéterminée.

Depuis les travaux de Pasteur et surtout depuis cette période scientifique si féconde, où la bactériologie prit un prodigieux essor et où, de 1880 à 1884, la plupart des bactéries pathogènes furent découvertes, il y avait eu un temps d'arrêt marqué dans les progrès de cette science nouvelle. En deux ans, on avait découvert, sous l'impulsion de Koch et grâce à ses méthodes, les bacilles de la fièvre typhoïde, de la morve, du choléra, du tétanos, de la diphtérie, les microbes de la suppuration, etc...

A cette période de féconde activité scientifique, succéda pendant plus de vingt ans, une période de calme relatif, au cours de laquelle aucun organisme pathogène intéressant ne fut découvert. Il faut en excepter toutefois la découverte du bacille de la peste par Yersin en 1894

et l'importante contribution de Veillon à la connaissance de nouveaux microbes anaérobies.

Tout le monde pensait alors que cet arrêt dans la série des découvertes de microbes pathogènes, tenait à l'insuffisance des méthodes de coloration ou de culture employées à cette époque. C'est ainsi que les microbes de la syphilis, des fièvres éruptives, et de bien d'autres maladies contagieuses des animaux restaient encore inconnus.

Cette façon de voir était vraie en partie ; elle était juste pour la syphilis, en particulier, où une technique de coloration nouvelle était nécessaire. En revanche elle était inexacte pour la plupart de ces autres maladies à germes inconnus.

Alors survint une notion nouvelle, *celle des microbes invisibles*.

Le mot de microbe a été créé par Pasteur pour désigner les infiniments petits. Mais si infime que soit la dimension des microbes connus, il en est d'autres plus ténus encore. On savait depuis longtemps que les pores de certaines porcelaines dégourdies, servant de filtres, arrêtaient les microbes. On croyait qu'elles les retenaient tous. Gallippe seul avait soutenu l'opinion contraire, émettant le premier l'hypothèse, reconnue exacte depuis, que des microbes invisibles traversaient les filtres Chamberland-Pasteur ou Berkefeld.

Quelle fut la genèse de cette notion ?

Loëflier et Frosch, les premiers, observèrent qu'en filtrant sur terre d'infusoires le contenu dilué d'une vé-

siècle aphteuse et en inoculant ensuite le filtrat, ainsi obtenu, à un animal sain, on déterminait la maladie. Semblable constatation fut faite par Nocard et Roux pour la péripneumonie. En filtrant sur bougie PASTEUR un bouillon de culture de péripneumonie et en injectant le liquide filtré à un animal sain, ces auteurs déterminèrent une péripneumonie typique chez cet animal.

D'autre part, dans ces deux expériences, l'examen microscopique du filtrat, fait à l'aide des plus forts grossissements connus, ne révéla rien à l'œil. Et l'ultramicroscope, plus tard, ne nous a pas donné de meilleurs résultats (1). On fut donc obligé dès les premières expériences de Loëffler d'admettre l'existence d'infiniments petits, *invisibles*, et passant à travers les filtres les moins poreux.

On pensa alors à filtrer systématiquement soit le sang, soit les humeurs d'animaux ou d'hommes atteints de ces maladies dont l'agent infectieux était inconnu. On constata que ce sang, que ces humeurs, conservaient leur pouvoir infectant après le passage au travers du filtre.

Les maladies infectieuses à microbes invisibles, et qui sévissent sur les animaux aussi bien que sur l'homme, sont déjà aujourd'hui au nombre d'une vingtaine au moins.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de réunir dans une étude d'ensemble les notions éparses qui existent dans la science sur ce sujet, si captivant et encore si mystérieux.

(1) Exception faite pour la péripneumonie.

Filtres usités pour la filtration des microbes invisibles

Nous donnons ici, en quelques mots, des explications rapides sur les filtres dont il sera question dans ce travail, ainsi que sur les annotations dont ces filtres sont marqués.

Les filtres usités pour la filtration des germes “ invisibles ” sont des filtres de porcelaine, comme celui de Chamberland, ou d'amiante comme celui de Garros, ou en terre d'infusoires comme celui de Berkefeld, Kitasato, et autres similaires.

Le plus ancien de ces filtres et le premier qui ait servi à la séparation des microbes des milieux liquides dans lesquels on les cultive, est le filtre Chamberland. Voici la description donnée par Chamberland lui-même, dans une conférence sur les microbes des maladies dans l'air et dans l'eau :

« Dans le laboratoire de M. Pasteur, on filtre les liquides dans lesquels on a cultivé des microbes, afin de les séparer du milieu liquide dans lequel ils se trou-

vent. Nous nous servons, à cet effet, d'un petit tube en porcelaine dégourdie, que nous avons fait construire spécialement dans ce but. Le liquide traverse la paroi poreuse sous l'influence de la pression atmosphérique, car nous faisons le vide autour du tube, à l'aide d'une machine pneumatique. On recueille ainsi, après plusieurs heures, quelques centimètres cubes de liquide absolument pur. »

Ce filtre, comme tous ceux dont il sera question dans cette thèse, a la forme d'une bougie. Il a une longueur de 16 cm., un diamètre intérieur de 10 mm., une épaisseur de 3 mm. 1/2, par conséquent un diamètre extérieur d'environ 17 mm.

La maison Chamberland construit aujourd'hui toute une série de bougies numérotées : L. 1 — L. bis — L. 2 — L. 3 — L. 5 — L. 7 — L. 9 — L. 11.

La bougie L. 1 étant constituée par la pâte la plus poreuse, et L. 11 par la pâte à pores les plus fins.

Les bougies Chamberland F et Chamberland B dont il sera question dans ce travail correspondent respectivement comme porosité aux nouvelles bougies L. 5 et L. 7.

Berkefeld ayant observé que l'eau qui sort des couches de terres d'infusoires de la lande de Lünebourg est d'un bleu pur, tandis que celle des marais voisins est jaune, eut l'idée de construire des filtres avec cette terre siliceuse cuite. Cette terre est formée de débris d'infusoires et principalement de diatomées.

Les filtres Berkefeld ont une forme analogue à celle

des filtres Chamberland et s'emploient de la même manière.

La maison Berkefeld construit 3 variétés de filtres, marqués d'une lettre différente suivant la porosité de la bougie.

La bougie Berkefeld N, est la bougie type, la bougie normale de cette maison

La bougie V est une bougie beaucoup moins poreuse que la bougie N.

La bougie W une bougie plus poreuse que la bougie N.

Le filtre Garros est constitué par des fibres d'amiante mises en poudre et agglomérées.

Quant au filtre Kitasato, c'est moins un filtre nouveau qu'un appareil de laboratoire usité depuis longtemps sur lequel peuvent s'adapter des bougies Chamberland ou Berkefeld. On fait le vide dans le récipient qui est autour de la bougie et on met le liquide à filtrer à l'intérieur de la bougie.

Les autres filtres, dont nous aurons exceptionnellement à faire mention, ne sont que des filtres en terre d'infusoires avec des modifications d'ordre secondaire.

CHAPITRE I

Bougies filtrantes et virus invisibles

Depuis les travaux de Lœffler sur la fièvre aphteuse et les recherches de Nocard et Roux sur le microbe de la péripneumonie le nombre des microbes dits « *invisibles* » s'est accru considérablement et leur importance en bactériologie devient tous les jours plus grande. On désigne d'une manière générale sous le nom de microbes « *invisibles* » les microbes « *filtrants* » à travers les bougies de porcelaine comme celles de Chamberland, ou en terre d'infusoires comme celles de Berkefeld, Kitasato, et autres similaires. Ces deux termes microbes « *filtrants* » et microbes « *invisibles* » ont-ils une équivalence absolue ?

Le terme de virus « filtrant » est-il rigoureusement synonyme de virus « invisible » ?

M. Borrel, entre autres, dans ses essais de filtration du virus claveleux a fait les remarques suivantes, que nous reproduisons ci-dessous :

Si la dilution a été faite avec de l'eau de robinet non stérilisée, le filtre laisse passer certains microbes, particulièrement petits, mobiles, des vibrions, des spirilles qui paraissent et se cultivent bien dans le liquide filtré

lui-même simplement conservé à la température de 20°. Ces microbes observés dans ces conditions de filtration sont toujours les mêmes, ce sont des microbes *mobiles*. Le passage de ces vibrions des eaux servait ordinairement de test au passage du virus claveleux.

Pour avoir le virus claveleux débarrassé de tout microbe d'impureté, il suffit de faire les dilutions avec de l'eau bouillie ; le liquide filtré, stérile dans toutes les conditions de culture jusqu'ici réalisées, est virulent et reste virulent pendant un certain temps.

Dans le cas de filtration rapide, extemporanée, jamais le virus, ni les vibrions des eaux ne passent à la bougie F.

Il en est autrement si sur la bougie F on filtre d'une façon continue de 1 à 7 jours. J'ai fait deux fois l'expérience, et j'ai constaté que d'abord rien ne passe ; mais au 4^e ou 5^e jour des microbes d'impureté, mobiles toujours, et d'abord les vibrions des eaux traversent le filtre, le liquide devient virulent.

Cette étude de la filtration nous montre donc qu'avec le virus certains microbes traversent les filtres. Ces microbes pourraient passer inaperçus s'ils ne cultivaient pas dans le filtrat ; ces microbes *décelables au microscope*, sont toujours des microbes mobiles, et c'est là un point qui me paraît important à noter ; il est certain que le passage des microbes immobiles à travers les filtres doit être beaucoup moins facile ; Ils peuvent être particulièrement retenus quelle que soit la petitesse de leur masse, par attraction sur les parois, tandis que les mi-

crobes mobiles à *masse négligeable par leur mobilité* peuvent échapper aux lois de l'attraction et passer sans qu'il soit nécessaire d'admettre une ténuité extrême.

Le passage à travers un filtre n'implique pas forcément l'idée d'un microbe invisible. La filtration du virus claveleux dans les conditions que nous venons de relater prouve néanmoins, conclut M. Borrel, et d'une façon certaine, que ce virus doit rentrer dans le groupe des microbes petits (bactéries ou ptozoaires) ; les formes coccidiennes décrites dans la vaccine, la variole, la clavelée, nous paraissent devoir être définitivement abandonnées et les recherches doivent être poursuivies dans d'autres directions ».

Ainsi donc, d'une façon absolue, les bougies filtrantes ne peuvent pas servir rigoureusement à différencier les microbes dits « *invisibles* » de ceux qui ne le sont pas. Mais elles établissent cependant à priori une distinction déjà suffisante entre tous les microbes bien connus et décrits et qui sont arrêtés par elles, et ceux qu'elles laissent passer. Si quelques-uns parmi ces derniers sont décelables au microscope, ce sont des microbes tous très petits, mobiles, et en petit nombre.

Cette distinction établie, il n'en reste pas moins vrai que d'une façon très générale les microbes traversant les filtres Chamberland, Berkefeld et Kitasato sont des microbes « invisibles » surtout si on s'entoure des précautions indiquées plus loin pour la filtration de ces germes. Et comme dit M. Remlinger, « il n'existe aucune bonne raison pour ne pas conserver le nom de

microbes « invisibles » aux microbes « filtrants ». La filtration des germes invisibles comporte certaines règles qui sont indiquées dans les lignes suivantes par M. Remlinger.

Conditions d'une bonne filtration

« L'étude des organismes ultra-microscopiques se heurte à une double difficulté. L'expérimentateur peut sécher par excès ou par défaut. Il peut sans raison suffisante classer un microbe parmi ceux qui traversent les filtres et il peut au contraire considérer comme arrêté par une bougie un germe qui en réalité la franchit. Quelles précautions convient-il de prendre pour éviter ce double écueil ?

Pour ne pas conclure trop rapidement à l'invisibilité d'un germe, il faut être pénétré des difficultés de toute nature que présente l'épreuve d'une bougie filtrante. En porcelaine, en alumine, en charbon, en terre d'infusoires, la bougie employée sera neuve. Elle aura été stérilisée à l'air sec ou à la vapeur d'eau, celle-ci rendant les bougies moins poreuses que celui-là. La filtration sera extemporanée. Plus elle sera courte et plus la sécurité sera grande. Sa durée ne doit jamais dépasser deux heures. Pratiquer une filtration sous une pression de plusieurs atmosphères est une lourde faute. L'idéal serait de se passer de la pression ou de l'aspiration en se servant d'entonnoirs Garros, analogues à ceux employés par Borrel dans ses expériences sur la filtration du virus claveleux. Il n'y a cependant aucun inconvé-

nient à effectuer une filtration sous la pression d'une poire de caoutchouc ou avec une aspiration de 50 à 500 m/m de Hg obtenue à l'aide d'une trompe à eau. Les opérations doivent être faites à la température ambiante. Une température un peu élevée, celle de 37° par exemple, paraît favoriser beaucoup le passage des germes. Les tests ont en la matière une importance majeure. On les mélangera toujours au liquide à filtrer. Quel test employer ?

Le Bacille fluorescent (Loëffer et Frösch) ? Le choléra des poules (Nicolle) ? Le vibron cholérique (Schüder) le *B. prodigiosus* et le *B. pyocyamique* (de Blasi) ? Il semble que la préférence doive être donnée aux très fins vibriens qui se trouvent dans la plupart des eaux, l'eau de Seine notamment. Il faut savoir que ces bacilles ne se développent que dans les milieux nutritifs extrêmement pauvres. Les filtrats ne doivent pas être ensemencés en bouillon, mais à la surface d'un cube de gélose ou plus simplement conservés tels quels à la température du laboratoire. A défaut de vibron des eaux, les microbes mobiles doivent toujours être préférés aux microbes immobiles.

Lemmer et Kolle ont affirmé que le virus pestique ne traversait pas les filtres. Nocard, Paul Bert, Babès ont fait pareille constatation pour la rage, de Blasi, pour l'acné varioliforme etc. . . . Or des recherches ultérieures ont démontré que tous ces virus traversaient les bougies. Il importe donc de ne pas se servir d'un filtre trop serré (Chamberland B, Berkefeld V), mais d'une bougie

dont la porosité soit à la limite de la perméabilité pour un test convenable.

On se méfiera du colmatage de la bougie par les matières albuminoïdes. Le résultat peut en être la superposition au premier filtre d'un deuxième à mailles plus serrées. Un premier moyen d'éviter cette cause d'erreur^r est d'opérer avec des dilutions étendues, surtout lorsque le liquide est albumineux. Un deuxième consiste à pratiquer une première filtration à travers une bougie très perméable telle qu'une Berkefeld V usée encore au couteau à verre. Le filtrat obtenu est à la fois riche en virus et débarrassé à peu près complètement de substances albuminoïdes susceptibles d'obstruer les pores d'une deuxième bougie à travers laquelle une deuxième filtration sera ensuite effectuée. Le colmatage est enfin d'autant plus marqué que la durée de la filtration est plus longue. Il peut donc être indiqué de servir des premières gouttes de liquides fournies par la bougie.

Les virus les plus filtrables sont partiellement retenus par les bougies. Il faut donc inoculer à la fois une grande quantité de filtrat et un nombre considérable d'animaux, en se rappelant le vieil adage qu'un seul fait positif a plus de valeur, que 100 faits négatifs. Cette rétention a pour conséquence une prolongation souvent très marquée de la période d'incubation. Tel est le cas de la fièvre jaune, de la rage, de la vaccine, du mollusum des oiseaux, de l'acné varioliforme conférés par les virus filtrés. »

Il faut ajouter en outre que la dilution du liquide à

filtrer doit être très étendue, comme l'a montré entre autres Loeffler pour la fièvre aphteuse.

Enfin M. Remlinger conclut que les bougies portant la même lettre et la même marque ne sont pas toutes identiques à elles-mêmes. « Il faudrait séparer complètement, dit-il, les bougies destinées à retenir les micro-organismes (filtration proprement dite) et celles qui doivent servir à des expériences sur les organismes ultra-microscopiques ; ces dernières exigent une notation différente des premières, très minutieusement établie d'après le débit fourni pour une pression déterminée dans l'unité de temps ».

Peut-on classer les microbes invisibles, d'après leur taille, par la facilité avec laquelle ils traversent la bougie filtrante ?

Tous les microbes filtrants et invisibles n'ont certainement pas la même dimension. Nous en connaissons un plus gros que les autres et qui est à la limite de la visibilité : celui de la péripneumonie.

La classification de ces germes d'après leur taille est-elle possible ? M. Marchoux en a fait l'objet d'une communication à la Société de Biologie. Voici ce que dit cet auteur :

« Cette classification basée sur la facilité plus ou moins grande des microbes à traverser, les filtres ne peut avoir de valeur que si les opérations sont conduites suivant des règles fixes.

1^o) La paroi d'une bougie est percée d'une infinité de pertuis capillaires par où passent les liquides qui filtrent. Or la viscosité d'un liquide se mesure par la rapidité d'écoulement de ce liquide au travers d'un tube plus ou moins étroit et d'une longueur déterminée.

Pour les liquides très fluides on se sert de tubes capillaires. La bougie n'est par suite qu'un viscosimètre pour liquides fluides. Il faut donc s'attendre à retrouver dans la filtration des divers liquides, avec approximation plus ou moins grande, suivant la nature des substances filtrantes, les constantes physiques déterminées au viscosimètre.

Et l'auteur ajoute : Plus les molécules sont serrées les unes contre les autres, plus elles éprouvent de difficultés à traverser un filtre. Ainsi, dans un mélange d'alcool et d'eau, la masse subit une contraction qui varie avec les proportions du mélange, la viscosité varie dans le même sens. Et c'est le mélange d'alcool et d'eau à 55 pour 100 qui est le plus visqueux. C'est celui qui filtre le plus difficilement. Les courbes, dit l'auteur, indiquant la marche de la contraction et la viscosité d'une part, le débit d'une bougie d'autre part, sont rigoureusement symétriques.

Mais outre la viscosité du liquide intervient la température. La viscosité diminue avec l'élévation de la température, en même temps qu'augmente la facilité du liquide à traverser les pores de la bougie. D'après M. Marchoux, pratiquement, on peut dire que le débit d'une bougie double pour une élévation de température de 20

degrés et qu'elle débite de fois plus de liquide à 90° qu'à 10°.

La vitesse du courant a aussi son importance. On peut admettre que le débit double quand la pression double. C'est une approximation très suffisante dans la pratique, dit M. Marchoux. Cet auteur a donné une formule plus précise qui résulte de ces expériences, sur la variation du débit avec la variation de pression : $an + b$ (n° 1), dans laquelle a est la pression initiale, n le multiple de cette pression, et b un coefficient qui varie avec chaque bougie et chaque température.

Quand on filtre des colloïdes, la pression exercée joue également un rôle considérable. Les matières colorantes passent facilement à travers les filtres, mais si on y ajoute un liquide visqueux, une solution de gomme arabique par exemple, on peut arriver, *sous une pression faible*, à empêcher le passage de matières colorantes, telle que le bleu de méthylène. Mais si on augmente la pression, le bleu de méthylène passe, même dans ces conditions. Le débit cependant, ici, ne va pas croître constamment avec la pression. Plus fort au début, il devient rapidement nul.

Pour la retenue sur les filtres de particules en suspension dans le liquide, la pression a aussi son importance.

« Quand on filtre des colloïdes à grosses micelles, dit M. Marchoux, comme le trisulfure d'arsenic, on obtient un passage beaucoup plus facile avec une pression modérée qu'avec une pression forte. Sans doute, avec une forte pression, la vitesse du courant entraîne

dans les pores de grosses particules qui en obturent la lumière. Avec une faible pression, ces particules se déposent lentement à la surface, où elles forment un feutrage qui diminue le débit, mais ne le supprime pas. Il suffit, en effet, dans ce cas, de brosser doucement la surface de la bougie pour lui rendre toute sa porosité. Les mêmes phénomènes s'observent dans la filtration d'un sérum.

Ainsi la bougie n'est en somme qu'un viscosimètre, imparfait, sans doute, surtout du fait du manque d'homogénéité de la pâte qui la compose, ainsi que l'ont fait ressortir Esmarch, Rosenau, Pfuhl, et les lois relatives au viscosimètre s'appliquent à la bougie. »

En appliquant ces lois, M. Marchoux pense que la bougie pourrait servir à classer les microbes filtrants. « Il faudrait, dit-il, que tout le monde adoptât les mêmes règles de filtration. Il conviendrait d'abord de déterminer la *porosité* de la bougie qu'on emploie. On en mesurerait le débit en eau distillée à 25° par exemple, par centimètre carré et par heure, sous une pression de 10 centimètres de mercure. Cette pression est facile à obtenir constante à l'aide d'un vase de Mariotte élevé à 1 m. 35. Il suffirait ensuite d'indiquer la *teneur en albumine* du liquide filtré, la *température* à laquelle est faite la filtration et la *pression* qu'exige le passage du virus. Bien entendu il est indispensable de conserver l'usage d'un test microbien, et de n'user que des premières gouttes de liquide filtré, Esmarch, Borrel, Pfuhl ayant montré qu'au bout de peu de temps des bactéries visibles et des protozoaires traversent les parois poreuses ».

Les microbes invisibles sont des êtres vivants.

Il existe enfin un dernier point à éclaircir au sujet des microbes invisibles, c'est l'existence même de ces microbes, en tant qu'*êtres vivants*.

L'hypothèse de toxines a été écartée par tous les auteurs qui ont étudié les microbes filtrants et invisibles. Leur opinion était basée sur l'observation des expériences d'inoculations et de l'évolution de la maladie ainsi communiquée. On sait du reste que déjà le microbe de la péripneumonie, à la limite de la visibilité a pu être cultivé.

Mais on peut apporter à l'existence de ces microbes une nouvelle preuve fournie par M. Chauveau.

M. Chauveau a fait une communication à ce sujet à l'Académie des Sciences en 1909, dans un exposé intitulé « *Les microbes pathogènes invisibles et les preuves physiques de leur existence* ». Voici ce que dit cet auteur :

« Un grand nombre de maladies virulentes, très variées, comptant parmi les plus répandues et les plus dangereuses, telles que la variole et la rage, sont engendrées par des microbes qui échappent encore aujourd'hui aux démonstrations expérimentales de la culture artificielle *in vitro*. Il se rencontre d'autre part que ces agents virulents ne peuvent être rendus visibles, dans leurs milieux naturels de culture *in vivo*, par aucun artifice de coloration. De plus ils passent facilement à travers tous les filtres.

On ne doute pourtant pas que ces agents ne soient des *êtres vivants*. L'un d'eux, en effet, celui de la péri-pneumonie bovine, a pu être déjà isolé et propagé artificiellement en dehors de l'organisme malade. Nous devons la connaissance de ce premier exemple à Nocard et Roux. Un second l'a suivi.

C'est assez pour justifier l'espérance de la même réussite dans tous les autres cas de maladies infectieuses à microbes filtrants et invisibles. Mais en attendant ce précieux et très désirable succès, qui donnera la *preuve physiologique*, c'est-à-dire la démonstration directe et décisive de l'existence de ces microbes ultra-microscopiques, ils ont droit au bénéfice de la démonstration indirecte empruntée aux *jeunes physiques* qui ont établi, il y a 40 ans passés, l'*individualité corpusculaire* des agents virulents.

Parmi ceux qui ont été étudiés alors se trouvaient l'agent de la morve et celui de la vaccine. L'agent de la morve est devenu depuis cette époque un type de *parasite microbien pathogène*, parfaitement visible et reproductible *in vitro*. L'autre est resté invisible et rebelle à toutes les tentatives de culture en dehors de l'économie animale. Mais les *faits physiques* qui ont démontré que ces deux virus se multiplient à l'*état solidien*, dans l'organisme vivant, ne permettent pas d'attribuer à l'agent de la morve. *Le virus vaccin est nécessairement un agent figure, un être vivant, parasite ultra-microscopique des espèces animales qui l'hébergent accidentellement.*

Et M. Chauveau pour établir que les *parasites invi-*

sibles, de plus en plus nombreux sont bien des agents vivants, reprend les expériences déjà faites en 1868 à propos de la vaccine, expériences qu'il a examinées de près en 1909 à la lumière des nouvelles acquisitions de la science.

A) *Méthode des dilutions progressives appliquées à la détermination de l'état physique de l'agent virulent de l'humeur vaccinale.*

On sait qu'une gouttelette de cette humeur inoculée sous l'épiderme avec la pointe d'une lancette chez l'enfant ou chez un jeune bovidé, y fait toujours naître sur place une pustule ombiliquée tout à fait typique. Le résultat ne manque jamais. Si l'humeur vaccinale est de bonne qualité, il pousse infailliblement autant de pustules caractéristiques qu'il a été fait de piqûres d'inoculation. Il était tout naturellement indiqué de connaître ce qui arrive quand l'humeur, au lieu d'être employée pure, a été diluée dans une quantité plus ou moins considérable d'eau distillée et qu'on inocule cette dilution de la même manière que ci-dessus, c'est-à-dire avec une gouttelette puisée au sein de la masse de liquide. Le résultat varie suivant le degré de la dilution.

a) Avec les dilutions relativement peu étendues, on continue à compter autant de pustules que de piqûres.

b) Si l'eau ajoutée est plus abondante, il peut arriver que la moitié seulement des inoculations soient fertiles et donnent naissance à des pustules.

c) Lorsque les dilutions sont très étendues, les inoculations fécondes deviennent rares et les pustules, in-

dices de cette fécondité, peuvent même manquer complètement, si les piqûres d'inoculation n'ont pas été très multipliées.

d) Dans aucun de ces cas, le diagnostic des suites locales de l'inoculation ne reste douteux. Il est toujours extrêmement net : ou bien le résultat est positif, et alors la pustule produite ne laisse rien à désirer ; ou bien ce résultat est négatif et il l'est si complètement qu'on serait bien embarrassé de trouver, sur le lieu de l'inoculation, la moindre ébauche de la pustule caractéristique. La plus grande importance s'attache à ces constatations.

e) *En somme, les choses se passent COMME SI LES agents virulents de l'humeur vaccinale étaient constitués par des éléments corpusculaires indépendants, tenus en suspension dans le liquide et que l'accroissement progressif du degré de la dilution éloignerait de plus en plus les uns des autres ; ce qui expose les petites gouttelettes puisées dans la masse liquide, pour garnir la pointe de la lancette, à n'en contenir aucun capable de proliférer : D'où la stérilité de l'inoculation.*

f) Ajoutons enfin que cette stérilité ne dépend en rien d'une atteinte quelconque portée par la dilution à l'activité du germe virulent. Si loin qu'elle soit poussée, la dilution d'une humeur vaccinale ne l'empêche jamais d'être parfaitement active quand la totalité du liquide est injectée dans les veines d'un cheval ou son tissu conjonctif sous-cutané. Le sujet est toujours très solidement vacciné par l'injection. Parfois même celle-ci provoque de beaux exanthèmes de vaccine généralisée,

comme dans les cas où la lymphe vaccinale est injectée à l'état naturel, sans addition d'eau.

Donc l'agent virulent de la vaccine, c'est-à-dire l'agent qui entretient indéfiniment la maladie par son passage incessamment renouvelé d'un sujet à un autre et sa multiplication in vivo, est bien un élément solidien en suspension dans l'humeur vaccinale et non une matière chimique en solution ou pseudo-solution dans le plasma de cette humeur. »

B) *Méthode de la diffusion appliquée à la lymphe vaccinals pour la détermination de l'état physique de ses agents virulents.*

« Cette méthode permet d'apporter, dit M. Chauveau, une très solide et très élégante confirmation à la conclusion des expériences précédentes.

Si l'on dépose, au fond d'une minuscule éprouvette, une certaine quantité d'humeur vaccinale, que l'on couvre ensuite, sans interposition de membrane dialysante entre les deux liquides, d'une couche d'eau pure, haute de 4 à 5^m/_m, les substances *cristalloïdes* et *colloïdes* de l'humeur y sont attirées par l'action de la *diffusion* ; et elles pourront l'être en très notable quantité, même ces dernières, malgré leur réputation méritée d'être relativement peu *diffusibles*. C'est ainsi qu'après 48 heures et même 24 heures seulement de *diffusion*, l'albumine est très facilement décelée dans les couches superficielles de l'eau, prélevées avec précaution à l'aide d'une pipette capillaire.

D'après les prévisions théoriques inspirées par les expériences de dilution, les substances que la *diffusion* a amenées ainsi dans les couches superficielles du *liquide diffuseur* n'ont pu leur communiquer la moindre activité virulente. Or c'est exactement ce que l'on constate en fait. *L'inoculation de ce liquide, chargé des éléments diffusibles de l'humeur vaccinal reste toujours stérile. Ni moi, ni d'autres, n'avons jamais vu naître de pustules vaccinales, après l'inoculation, dans les innombrables expériences consacrées à cette étude.* Pour obtenir l'éruption pustuleuse dans ces expériences de *diffusion*, il faut se servir de gouttelettes puisées dans les couches inférieures du *liquide diffuseur*. Les actions cinétiques moléculaires dont il est le siège n'y entraînent pas seulement les *substances cristalloïdes* en solution vraie dans l'humeur vaccinale et les *substances colloïdes* à l'état de pseudo-solution ou d'émulsion extra-fine. Cet entraînement peut s'exercer aussi sur les *particules solidiennes* en suspension proprement dite. On s'explique ainsi qu'il fasse monter, jusqu'à une certaine hauteur, une partie des corpuscules virulents invisibles, qui sont disséminés dans l'humeur.

Cette stérilité absolue des couches superficielles du liquide diffuseur, où ne manque pourtant aucun des éléments diffusibles de l'humeur vaccinale, y compris ses colloïdes, constitue une raison nouvelle d'attribuer la virulence aux éléments solidiens suspendus dans cette humeur et d'en destituer les substances chimiques cristalloïdes ou colloïdes, qui y sont en solution ou pseudo-solution.

Du reste la *diffusion*, appliquée aux bouillons de culture de microbes visibles, reproductibles *in vitro*, donne exactement les mêmes résultats. Qu'ils soient ou non éminemment toxiques, les produits *colloïdes* de la culture, attirés dans les couches superficielles du *liquide diffuseur*, se montrent également impropres à toute auto-reproduction, quand on les sème, sans leurs microbes producteurs, dans l'organisme animal ou les milieux artificiels des cultures *in vitro* ».

Et M. Chauveau, après avoir réfuté les quelques critiques que les récentes découvertes sur l'état colloïdal de la matière avaient pu faire naître contre ces deux ordres d'expériences qui forment un faisceau très homogène et solide, conclut de la façon suivante :

« Les inoculations d'humeur vaccinale en *dilution progressive* continuent à démontrer, dans l'humeur, l'existence d'éléments solidiens remplissant le rôle d'agents virulents.

« D'autre part, les expériences de diffusion continuent à exclure de toute participation à ce rôle les colloïdes que l'humeur vaccinale contient à l'état d'extra-fine émulsion.

« D'où il résulte que *les agents invisibles de la virulence de la vaccine, ainsi que leurs nombreux congénères*, indéfiniment transmissibles *in vivo*, ont conservé tous leurs droits à être considérés comme des *êtres vivants parasites*. Ces agents virulents tiennent une place des plus considérables dans le domaine de l'histoire naturelle du monde animé, quoique leur *invisibilité*

ne permette pas au naturaliste d'en étudier la morphologie. Réduit à ses seules ressources, celui-ci serait même incapable de démontrer l'existence de ces extraordinaires parasites. A fortiori, ne saurait-il les déterminer spécifiquement. Pour lever quelques-uns des voiles sous lesquels ils se dérobent si complètement, il faut que le chercheur s'inspire des principes et des méthodes de la *physique moléculaire* et de la *physiologie pathologique*. Ce sont là des départements scientifiques aussi éloignés l'un de l'autre qu'ils le sont eux-mêmes de l'*histoire naturelle*. Les microbes virulents invisibles, par les exigences de leur étude, établissent néanmoins, entre ces trois régions de la science, une curieuse solidarité. Ce n'est pas le moindre motif du grand intérêt qui s'attache à cette partie si spéciale du monde microbien pathogène ».

En dehors du fait qu'ils sont invisibles avec les instruments les plus puissants et passent à travers les filtres retenant tous les microbes connus, les virus « invisibles » présentent un ensemble de caractères communs qui mérite de retenir l'attention :

1) Ils sont tous ou à peu près tous incultivables (1).

2) Ils sont en général peu résistants, à l'action de la chaleur notamment. Le virus de la fièvre jaune est détruit à 55° en 10 minutes (Reed et Carroll) en 5 minutes (Marchoux, Simond, Salimbeni).

(1) Exception faite pour le microbe de la péripneumonie qui est comme on le sait à la limite de la visibilité et qui a pu être cultivé sur milieu spécial in vitro.

— Le virus de la rougeole par un chauffage de 15 minutes à 55°.

— La lymphie aphteuse perd sa virulence par un chauffage de 15 minutes à 55°.

— Le virus claveleux est détruit en 3 minutes à 56-58°.

— Le virus de la peste aviaire en 3 minutes à 65°.

Le virus rabique est détruit par un chauffage à 40° pendant quelques heures (Barbès), ou à 47°-4° pendant 10 minutes et même 5 minutes (Galtier).

3) Comme conséquence de cette faible résistance, de Blasi a signalé que les maladies à microbes invisibles se transmettent presque toujours par contact direct ou inoculation directe.

La fièvre jaune, la dengue, la fièvre à papatacii, la rage, sont des types de maladie par inoculation. Dans l'étiologie des autres maladies à microbe invisible, rougeole, variole, scarlatine (?) et chez les animaux, peste bovine, peste aviaire, molluscum contagiosum, etc., le contact direct pour un rôle prépondérant.

4) Enfin M. Remlinger qui a déjà attiré l'attention en 1906 sur les analogies que présentent entre eux les microbes filtrants, signale en outre que les lésions anatomopathologiques déterminées par ces microbes sont très voisines les unes des autres. « Dans toutes les affections à microbe invisible on rencontre les mêmes inclusions potoplasmiques, que rien n'autorise à considérer comme des parasites. La réaction de l'organisme vis-à-vis du virus se traduit essentiellement « par la

prolifération des épithéliums et la formation de pustules ou même de petites tumeurs épithéliales » (Borrel), par une « prolifération cellulaire pure épithéliale ou conjonctive, de type néoplasique, avec mononucléose légère de la lésion et du sang. » (Bosc).

Quelle a été l'utilité de l'ultra-microscope pour l'étude des microbes « invisibles »

On peut dire que cet instrument qui a été pour l'étude des colloïdes d'une si grande importance, n'a été malheureusement d'aucune utilité pour les organismes « filtrants » et « invisibles ». Il ne nous a rien appris de nouveau. Exception faite cependant pour le microbe de la pèripneumonie, à la limite de la visibilité.

Les microbes « invisibles » sont des germes extrêmement petits qui continuent à nous échapper, et dont nous ne pouvons révéler l'existence, comme le dit M. Roux, que par leur action pathogène (1).

« Les dimensions de ces microbes, dit cet auteur, sont voisines de celles des longueurs d'onde de la lumière ; pour les rendre distincts, il faudrait employer des radiations plus courtes et elles ne seraient pas perçues par notre œil. Il est vrai qu'on peut lui substituer

(1) Exception faite pour le microbe de la pèripneumonie qui a pu être cultivé.

une plaque photographique, et nous verrons peut-être un jour l'image photographique de ces petits êtres, si toutefois on surmonte les difficultés de la mise au point ».

CHAPITRE II

Maladies spéciales à l'homme, ou communes à l'homme et aux animaux

FIÈVRE JAUNE

C'est la commission Américaine, envoyée en 1900 à Cuba et à la Havane pour y étudier la fièvre jaune, qui a signalé que l'agent pathogène de cette affection était un microbe invisible, existant dans le sang des malades pendant un nombre de jours déterminé. Cette commission montra encore que ce microbe, invisible avec les appareils les plus puissants, était en outre incultivable sur les milieux usuels de laboratoire.

Les résultats obtenus jusqu'en 1900 dans les diverses recherches concernant le bacille de la fièvre jaune, n'étaient pas concluants. Les différentes expériences de Sanarelli, d'Archinard et Woodson en 1887 à la Nouvelle-Orléans, de Wasdon et Geddings à la Havane, et d'Agramonte à Cuba tendant à la découverte d'un bacille ictéroïde que cet auteur pensait avoir trouvé dans le sang des malades vivants et dans les organes après la

mort, toutes ces expériences n'avaient pas établi d'une façon certaine et indiscutée l'existence d'un microbe spécifique, icteroïde ou autre, dans le sang des individus atteints de fièvre jaune.

Les membres de la commission américaine essayèrent d'abord de mettre en évidence, par des cultures, l'agent pathogène de la maladie. Pendant 3 mois, juin, juillet et août 1900, ils firent des expériences portant sur 18 cas différents. Du sang était retiré à des malades atteints de fièvre jaune, à la médiane basilique, et mélangé à du bouillon dans la proportion de 10 cc. de bouillon pour 0 cc. 5 de sang. Le mélange ainsi obtenu restait à l'étuve à 37° pendant une semaine.

Sur 7 cas : 4 concernaient des malades atteints de fièvre jaune bénigne, et 3 des cas de fièvre jaune plus sévère. Des cultures furent faites avec du sang du premier, du deuxième, du troisième et du quatrième jour de la maladie.

Pour les autres 11 cas, qui étaient des formes graves de la maladie, dont quatre moururent, les cultures furent faites beaucoup plus nombreuses et répétées et, pour deux cas mortels, on en fit chaque jour du commencement à la fin de la maladie.

Dans les uns et les autres cas les résultats furent négatifs.

Walter Reed, président de la commission, essaya depuis de cultiver le sang de 6 autres malades atteints de fièvre jaune, mais les résultats furent toujours négatifs.

Le virus de la fièvre jaune était donc incultivable. Il était de plus invisible avec les plus forts grossissements.

Walter Reed et d'autres membres de la Commission firent des examens microscopiques répétés à diverses périodes, et n'arrivèrent à la découverte d'aucun protozane, microbe ou autre organisme vivant, intracellulaire ou extracellulaire. Avec 1/12 zeiss à immersion le microbe de la fièvre jaune restait invisible.

La présence de ce microbe dans le sang ne pouvait cependant être mise en doute, car les inoculations étaient nettement positives, sous certaines conditions cependant.

Sternberg en 1887 à 5 injections sous la peau d'un individu non immunisé une pleine seringue de sang d'un malade atteint de fièvre jaune depuis 8 jours. Il n'obtint pas de résultat. Les expériences de Walter Reed portent sur une dizaine de soldats américains et émigrants espagnols non immunisés.

Les injections faites furent de diverses sortes :

1) Injection de sang frais pris dans une veine du pli du coude ;

2) Injection de sang partiellement défibriné ;

3) Injection de sang partiellement défibriné et chauffé pendant 10 minutes à 55°.

4) Injection de sérum sanguin préalablement dilué avec de l'eau stérilisé et *filtré* lentement à travers un filtre Berkefeld de laboratoire.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

N ^o des cas	QUANTITÉ ET NATURE DE L'INJECTION	JOUR de la maladie	DATE DE L'INOCULATION	RÉSULTATS	DATE DE L'APPARITION DE LA MALADIE
1	2 cc sang frais.	2 ^e	26 septembre 1900	Négatif.	
2	2 cc id.	2 ^e	4 janvier 1901	Positif.	8 janvier 1901
3	1.5 cc id.	1 ^{er}	8 janvier 1901	Positif.	11 janvier 1901
4	0.5 cc id.	2 ^e	22 janvier 1901	Positif.	24 janvier 1901
5	1 cc id.	2 ^e	25 janvier 1901	Positif.	28 janvier 1901
6	0 cc 75 de sang partiellement défibriné.	3 ^e	15 octobre 1901	Positif.	20 octobre 1901
7	1 cc 5 de sang partiellement défibriné et chauffé 10 ^m à 55.	3 ^e	15 octobre 1901	Négatif.	
8	Même que n ^o 7.	3 ^e	15 octobre 1901	Négatif.	
9	Même que n ^o 7.	3 ^e	15 octobre 1901	Négatif.	
10	1 cc 5 de sérum sanguin filtré.	3 ^e	15 octobre 1901	Positif.	19 octobre 1901
11	Même que n ^o 10.	3 ^e	15 octobre 1901	Positif.	19 octobre 1901
12	Même que n ^o 10. { 2 cc de sang frais.	4 ^e	22 octobre 1901	Négatif. Positif.	 23 octobre 1901

On voit d'après ce tableau que des 7 individus qui reçoivent une injection sous-cutanée de sang frais ou partiellement défibriné en quantité de 0 cc 5 à 2 cc , six (85,7 o/o) eurent une attaque de fièvre jaune, sans la période habituelle d'incubation de cette maladie.

Les résultats ci-dessus ont le grand intérêt de montrer que l'agent spécifique de la fièvre jaune est présent dans le sang pendant le premier, le deuxième et le troisième jour de la maladie.

En outre les auteurs combinant les essais de culture avec les inondations ont fait l'expérience suivante : On retira 2 cc. de sang à un malade atteint de fièvre jaune, 0 cc. 5 sur ces 2 cc. furent injectés à un individu et déterminèrent chez lui une fièvre jaune de forme grave, le reste des 2 cc., soit 1 cc. 5, fut réparti dans 4 tubes contenant du bouillon et ne donnèrent lieu à aucune production de microbe, sauf dans un où on remarqua vers le 4^e jour, ce que les auteurs appelèrent un « *staphylococcus hyogenes citreus* » et qui n'est, d'après eux, qu'un microbe banal de l'infection de la peau dans la région du Cuba.

Les travaux de Reed et Carroll sur la nature du virus de la fièvre jaune furent confirmés et complétés en 1903 par la Commission française de la Fièvre jaune composée de MM. Marchoux, Salembeni et Simond.

Ces auteurs établirent à nouveau que le virus de la fièvre jaune traverse, en effet, le filtre Berketeld. Ils démontrèrent que ce virus traverse en outre le filtre

Chamberland F, mais comme ils opéraient sur du sérum *non dilué* ils ne purent obtenir la filtration à travers Chamberland B.

Ils ont en outre prouvé que la maladie pouvait être transmise par l'injection sous la peau d'une très faible quantité de sang 0 cc. 1 ; que, dans le sang défibriné et conservé le virus reste actif pendant 5 jours mais devient inactif au bout de 8 jours bien que ce sang soit capable cependant de conférer une immunité relative ; que 5 minutes de chauffage à 55 degrés centigrades rendent le virus inoffensif ; que, l'exposition à l'air à une température de 24 à 30° centigrades rend le virus inactif.

Les travaux de Rosemeau, Parker, Francis et Beyer, confirmèrent à leur tour les travaux des Commissions Américaines et Françaises, spécialement en ce qui concerne la transmission de la maladie par le sang filtré. Ils montrèrent, en outre, que, en se servant de sérum *dilué*, le virus traverse non seulement le filtre Chamberland F, mais le Chamberland B, et les résultats négatifs obtenus par la Commission française à ce dernier point de vue, venaient de ce que cette commission avait filtré du sérum *non dilué*. Les auteurs cités plus haut, réussirent en effet à transmettre la fièvre jaune à trois individus sains en se servant de sérum sanguin filtré à travers Chamberland B, deux de ces individus reçurent 5 cc. de sérum filtré et l'autre 3 cc. 5. Leurs expériences, faites avec tout le soin voulu, prouvent, dit M. Graig, que le virus de la fièvre jaune est susceptible de traverser les filtres les plus serrés.

De ces diverses expériences il est permis de conclure :

1° Que le microbe de la fièvre jaune est présent dans le sang des malades pendant les 3 premiers jours de la maladie, les expériences d'inoculations faites dans ce délai ayant été positives.

2°) Que ce microbe est invisible avec les plus forts grossissements.

3°) Qu'il est incultivable.

4°) Qu'il traverse les filtres arrêtant les autres microbes connus. L'inoculation du filtrat à travers Chamberland F et Berkefeld, et à travers Chamberland B si on se sert de sérum dilué, a donné, en effet, des résultats positifs, après une période d'incubation moyenne de 3 à 4 jours.

5°) Ce microbe est enfin détruit par un chauffage pendant 5 à 10 minutes à 55°, comme le montre les cas (nos 7-8-9) des expériences de Reed et Carroll, confirmées par celles de MM. Marchoux, Salembeni et Simond. Cette dernière propriété prend de l'importance à la lumière de ce que nous savons aujourd'hui, car, c'est un des caractères communs des germes invisibles, d'être détruit par un chauffage relativement court à une température relativement basse.

DENGUE

Dans le *Philippine Journal of Sciences* de 1907, les auteurs Ashburn et Graig ont fait une étude détaillée de l'étiologie de la Dengue. Ils ont observé et étudié l'épidémie du fort Mc. Kinley, fort situé à environ cinq milles de Manille et où stationnaient 2 régiments d'infanterie, 2 escadrons de cavalerie, une batterie d'artillerie de campagne et une compagnie du génie. Les barraquements de l'Infanterie étaient situés dans la partie la plus basse du poste, près d'un petit cours d'eau recouvert d'une abondante digitation tropicale, et, qui constituait ainsi, un nid idéal pour les moustiques. L'épidémie débuta en effet dans les barraquements du seizième régiment d'infanterie qui était le plus proche du cours d'eau. De là elle s'étendit à diverses compagnies, mais respecta presque complètement la batterie d'artillerie de campagne et la compagnie du génie des Etats-Unis dont les barraquements étaient situés au moins à deux mille de ce cours d'eau, sur une hauteur et sur un terrain bien drainé.

Les étapes de l'épidémie à travers les diverses compagnies sont longuement détaillées dans le rapport de

MM. Ashburn et Gray, où certaines compagnies furent frappées jusqu'à 58 o/o.

Les auteurs démontrent que la dengue n'est pas contagieuse directement et ils citent le fait suivant : Le 1^{er} août 1906, le premier bataillon du 13^e régiment d'infanterie et le second bataillon du 16^e furent envoyés en service en campagne à Leyte. Pendant la période où le premier bataillon du 13^e régiment d'infanterie était resté au fort de Kinley 58 hommes avaient été envoyés à l'hôpital pour la dengue. Mais pendant le voyage de ce bataillon il n'y eut aucun cas à bord, ni pendant le séjour à Leyte. Il en fut de même pour le second bataillon du 16^e régiment d'infanterie qui avait eu 20 cas de dengue, à Mc Kinley et qui, trois jours avant son départ, avait encore envoyé à l'hôpital cinq malades atteints de Dengue. Mais il n'y eut aucun cas à bord pendant le voyage ni pendant le séjour à Leyte.

En outre les auteurs signalent que 400 malades atteints de dengue furent soignés dans les salles communes de l'hôpital, sans précaution spéciale contre la contagion et qu'aucun cas nouveau ne survint dans ces salles, sauf pour trois militaires qui furent de service la nuit. Dans le camp où ils se trouvaient, ils eurent à soigner 128 cas de dengue. Là les infirmiers, domestiques et malades se réunissaient à leur gré, les hommes sains et les malades dormaient et mangeaient ensemble, ils échangeaient leurs vêtements sans précaution aucune, et malgré cette vie en commun aucun des hommes bien portants ne prit la dengue et tous ceux qui étaient

malades se rétablirent. Les auteurs concluent nettement, après ces divers faits, que la dengue n'est pas une affection contagieuse directement, et ils incriminent comme agent de transmission un moustique, reprenant ainsi l'idée émise par Graham. Ils en voient une preuve dans le fait de la transmission irrégulière de la maladie d'un baraquement à l'autre, où aucun ordre n'était suivi et où la maladie apparaissait dans des points très éloignés l'un de l'autre, respectant les intermédiaires.

Après ces considérations sur la transmission de la Dengue nous en arrivons à l'agent lui-même cause de l'infection, au microbe.

Les recherches ont été nombreuses de la part de tous ceux qui ont étudié la dengue en ce qui concerne l'agent pathogène lui-même, on a découvert de nombreux microbes, mais en réalité aucune de ces prétendues découvertes n'a résisté à un examen attentif, beaucoup d'entre elles du reste datent d'une époque où la science bactériologique n'était qu'à son début, et où les méthodes étaient défectueuses.

Nous citerons seulement les travaux de M^c Langhlin, Graham, Carpenter et Sutton, Guiteras et Agramonte, que nous résumons en quelques mots.

M. Langlin dont les observations furent publiées en 1886, croyait que la dengue était contagieuse directement et que des bactéries existaient dans le sang des malades. Il fit des examens microscopiques du sang, de l'urine, et jusque dans les vomissements des malades, il fit des cultures avec du sang mis dans des ballons (sans

bouillon) où il le laissa de six semaines à trois mois, il répéta ses expériences sur une quarantaine de cas. Dans chaque cas il trouva à l'examen un micrococcus ayant un $1/12$ à $1/13$ du diamètre d'un globule rouge, microccus qu'il retrouva dans le sang mis en culture. MM. Ashburn et Graig n'attachent à ces expériences qu'un intérêt historique. Klein, en effet, rechercha soigneusement la présence d'un microbe quelconque dans le sang des malades atteints de dengue et il n'en trouva aucun ayant un rapport constant avec la maladie. Wright n'arriva jamais à mettre en évidence un organisme dans le sang, pas plus que Crookshank et Mac Fadyan.

Les travaux de Graham en 1903 marquent une étape et une direction nouvelle dans l'étude bactériologique de la dengue. Cet auteur publia à Beyrouth, des observations où il signalait dans les globules rouges des malades atteints de dengue la présence d'un protozoaire ressemblant au plasmodium du paludisme, sans granulation. Il examina une centaine de cas, mais sans spécifier dans combien de cas il trouva le parasite. Assimilant plus complètement au point de vue étiologique la dengue au paludisme cet auteur émettait l'avis d'un stade de développement de ce parasite dans le moustique, agent de transmission de la maladie.

En disséquant des moustiques qui avaient piqué des malades atteints de dengue il dit avoir trouvé dans le sang soustrait par le moustique, le parasite jusqu'au cinquième jour après la piqure, mais il avoue n'avoir jamais trouvé ni zygotes, ni aucune forme sexuée dans le

moustiqué. De plus Graham dit avoir découvert des spores du parasite dans les glandes salivaires des moustiques quarante-huit heures après qu'ils eurent piqué un malade atteint de dengue au 4^e jour de sa maladie. Il fit même l'expérience suivante : il inocula dans le tissu cellulaire sous-cutané d'un individu, du sérum contenant des glandes salivaires d'un moustique qui avait piqué un malade atteint de dengue, 24 heures auparavant. Le sujet a une fièvre grave ressemblant à la dengue. L'auteur ne répéta pas l'expérience en raison de la gravité des symptômes déterminés.

Les publications de Graham furent très commentées et déterminèrent une série de travaux de contrôle qui ne furent pas en faveur des résultats de Graham.

On ne retrouva pas à la suite de Graham le plasmodium que cet auteur avait vu, et Carpenter et Sutton qui étudièrent 200 cas de dengue à l'Isthme de Panama, aussi bien que Guiteras qui fit de sérieuses observations à la Havane en 1905, conclurent qu'ils ne trouvaient dans le sang aucun parasite, protozoaire ou bactérie.

C'est également à cette opinion qu'aboutirent les recherches des laboratoires du Gouvernement à Manille en 1900, où il est dit que l'hématozoaire de Graham, ni le micrococus de M^c Laughlin n'ont pu être retrouvés.

Enfin Agramonte qui étudia la maladie à la Havane en 1906, Jonge et Hann à Java, apportèrent la même conclusion, il n'existe dans le sang des malades atteints de dengue, aucun parasite visible.

MM. Ashburn et Gray ont prêté, de leur avis, la plus grande attention à l'étude bactériologique de la Dengue et à la recherche de l'agent pathogène de cette maladie. Ils ont fait des examens de sang frais et des préparations colorées avec les méthodes les plus variées y compris la méthode de Wright et celle usitée pour le *Tréponema pallidum*. Cette dernière même fut appliquée avec un soin particulier car au début de leurs expériences ces auteurs inclinaient à penser qu'il s'agissait peut-être d'un spirochète. Les examens furent nombreux et faits à diverses périodes de la maladie. Ces auteurs déclarèrent n'avoir rien trouvé, ni le micrococcus de M^e Laughlin, ni le protozoaire de Graham, ni aucun autre parasite visible. Mais à l'inverse de Graham qui prétendait qu'il s'agissait d'un hématozoaire qui détruisait les globules sanguins, ces auteurs ont montré que, quel que soit le parasite de la dengue, la composition normale du sang ne subissait pas de variation appréciable, sauf en ce qui concerne les proportions respectives des différentes formes de leucocytes.

Devant l'insuccès des examens microscopiques Ashburn et Graig essayèrent de cultiver le sang des malades, dans l'espérance d'y voir se développer le microbe objet de leurs recherches et qui dans leur esprit devait être du même groupe que celui de la fièvre récurrente.

Ils firent d'abord des cultures de sang citraté. Pour cela ils remplirent une seringue stérilisée avec une solution citratée qu'ils rejetèrent ensuite en laissant seulement une minime partie dans l'aiguille. Après cela

ils retirèrent de la veine médiane basilique, avec la même seringue, une pleine seringue de sang qui fut placé dans de petits tubes de verre dont les uns furent mis à l'étuve à la température de la pièce et les autres placés dans une glacière pour faciliter le développement d'un microbe possible qui aurait passé une partie de son cycle évolutif dans un animal à sang froid. Ils firent ainsi, en s'entourant de toutes les précautions aseptiques possibles, huit essais différents avec des malades à diverses périodes de la maladie.

Ils n'arrivèrent ainsi à mettre en évidence aucun organisme qui puisse avoir une signification étiologiste quelconque. Ils eurent dans deux cas un petit diplocoque mais, comme on le verra plus loin, le microbe de la Dengue passant à travers les filtres, ce diplocoque ne pouvait donc avoir aucune importance.

Les cultures sur bouillon furent faites de la façon suivante : 10 cc. de sang, obtenus par soustraction veineuse, furent mis dans 250 cc. de bouillon et placés à l'étuve à la température de 26° à 36°, 05 cc. pendant 8 semaines. Douze essais furent tentés de la sorte. Là encore aucun résultat de quelque valeur. Il y eut des microbes divers, dûs à la contamination, dans quelques ballons, quelques staphylocoques dans un, quelques diplocoques dans 3 autres, mais rien de constant, et dans 4 ballons le bouillon resta absolument stérile.

Ce microbe qu'on ne voit pas aux plus forts grossissements, et qui ne cultive pas, existe dans le sang comme le montrent les diverses expériences suivantes d'inoculation.

Les inoculations à des hommes sains de sang de malades atteints de dengue furent faites intra-veineuses. Elles se divisent en 2 séries, dans la première série les auteurs injectèrent du sang non filtré, et dans la deuxième du sang filtré.

Les expériences de la première série ont été effectuées sur 8 volontaires.

Le sang était retiré des malades au 3^e ou 4^e jour de la maladie.

La quantité de sang inoculée aux volontaires par voie veineuse était de 20 gouttes.

Les résultats furent positifs dans les 8 cas. La période d'incubation était en moyenne de 3 ou 4 jours.

Pour les expériences avec le sang filtré les auteurs se sont servi comme filtre en terre d'infusoires, éprouvé avant chaque expérience. La filtration du sang sur ce filtre était faite sous une pression de 730 millim.

Le contrôle du filtre était effectué avec du micrococcus melitensis et du bacille du choléra cultivés dans du bouillon. Le filtrat après chaque contrôle était mis à l'étuve pendant quinze jours et examiné chaque jour. Dans tous les cas ce filtrat resta stérile. Les filtrations de contrôle étaient effectuées comme pour le sang sous une pression de 730 millim. Le filtre était naturellement soigneusement stérilisé après chaque essai.

Le sang à filtrer était retiré de la veine médiane basilique d'un malade atteint de dengue typique au 3^e jour de la maladie. La quantité retirée fut de 10 cc. Ce sang rapidement défibriné fut dilué avec une quantité égale

de sérum normal, et filtré à travers le filtre cité précédemment. Le produit de la filtration fut suffisant au bout $3\frac{1}{4}$ d'heure. 50 gouttes du filtrat contenant 20 gouttes de sang filtré furent inoculés à un premier malade qui eut une attaque de dengue sévère après une incubation de 4 jours.

Une seconde expérience avec du sang d'un autre malade fut effectuée sur un deuxième volontaire avec toute la série des opérations indiquées, et ce dernier eut comme le précédent une attaque de dengue de forme grave après une incubation de 5 jours.

Les auteurs attirent l'attention sur la gravité des cas de dengue qu'ils ont déterminés avec le sang filtré sans d'ailleurs en donner l'explication.

Ainsi le microbe de la dengue existe dans le sang des malades et passe à travers un filtre retenant les organismes aussi petits que le micrococcus meletensis (0,4 m. de diamètre).

Les essais de culture tentés avec le sang filtré par MM. Ashburn et Graig sur divers milieux ont été constamment négatifs.

De leur longue série d'expériences, MM. Ashburn et Graig apportent les conclusions suivantes :

- 1^o) Aucun organisme, ni bactérie, ni protozoaire ne peuvent être mis en évidence, ni dans le sang frais ni dans les préparations colorées de sang de dengue ;
- 2^o) Le nombre des globules rouges est normal ;
- 3^o) Il n'y a aucun changement morphologique des globules blancs ou rouges ;

4°) Il y a par contre une modification très marquée des proportions respectives des globules blancs ; les polynucléaires sont diminués, les petits lymphocytes très augmentés ;

5°) On ne découvre aucun organisme dans les cultures de sang, citraté, ou mélangé à du bouillon ;

6°) L'inoculation intra-veineuse à un homme sain du sang d'un malade atteint de dengue détermine chez le premier une attaque de dengue typique ;

7°) Il en est de même pour l'injection intra-veineuse de sang filtré ;

8°) L'agent pathogène de la maladie est ultra-microscopique.

Enfin ces auteurs terminent en ajoutant que la Dengue n'est pas une maladie contagieuse et qu'elle est transmise par un moustique *Culix fatigans*.

ROUGEOLE

Dans le « Journal of the American Medical Association » de septembre 1911, MM. Anderson et J. Goldberger, publient les résultats de leurs études sur le virus de la rougeole.

Au sujet de la filtration de ce virus les auteurs ont

fait quatre expériences différentes. Dans chaque expérience ils se sont servis de sérum sanguin obtenu par centrifugation de sang défibriné, et dilué dans trois parties de sérum physiologique. Ils ont filtré le mélange ainsi préparé sur bougie Berkefeld.

Ces filtrations furent suivies d'inoculations au singe du filtrat. Les deux premières expériences furent négatives. Dans la troisième ils inoculèrent quatre singes avec le sérum filtré ; ce sérum avait même dû subir deux filtrations sur Berkefeld à cause d'un accident survenu dans la première filtration. De ces quatre singes, un seul présenta une réaction suffisamment nette et caractéristique de rougeole.

Dans la quatrième expérience deux singes furent inoculés avec du sérum filtré. L'un d'eux eut une réaction très nette avec une éruption qui apparut 21 jours après l'inoculation. De ce dernier animal on prit une certaine quantité de sang avec lequel on inocula deux autres singes (*macacus sinicus*) dont l'un eut une réaction très caractéristique.

Les auteurs concluent de ces diverses expériences que le virus contenu dans le sang des rougeoleux est capable de traverser le filtre Berkefeld.

Ce virus, comme tous ceux de son espèce, présente une faible résistance à la chaleur. MM. Anderson et Goldberger soumirent du sang reconnu infecté et susceptible de transmettre la rougeole, à l'action de la chaleur pendant quinze minutes, une première fois à 57° et dans deux autres expériences à 55°. Dans

ces trois expériences, après le chauffage indiqué, le sang ne transmettait plus la maladie.

Ce virus, jusqu'ici inconnu, existe dans le sang des malades, comme le prouvent les expériences ci-dessus et aussi toute une série d'inoculations directes et de transmissions de la maladie avec du sang de rougeoleux qui ont été faites sur le singe par Heektoën en 1905, par Anderson et Goldberger en 1911, et Nicolle et Conseil également en 1911. Il est inutile d'insister ici sous ces expériences d'inoculations dont les résultats ont été positifs, et qui ne font plus de doute pour personne. Les phénomènes caractéristiques apparaissaient après une période d'incubation variant de 5 à 6 jours.

On remarquera ici combien était plus longue la période d'inoculation avec le sérum filtré. C'est là un phénomène que l'on retrouve dans presque toutes les maladies à microbes invisibles.

MM. Anderson et Goldberger ont essayé de cultiver à 37° le virus de la rougeole en ensemençant du bouillon avec du sang provenant de 4 rougeoleux. Les résultats furent négatifs. Il en fut de même dans les divers essais qui furent tentés avec du sang provenant de singes inoculés et présentant une rougeole bien nette.

Donc le microbe de la rougeole, comme ses congénères, est incultivable.

Il existe dans le sang des malades au moins pendant les 30 premières heures de l'éruption, c'est ce qui ressort des travaux de MM. Anderson et Goldberger, après ceux de Hecktoën.

Il passe à travers le filtre Berkefeld, et enfin il est détruit par un chauffage de 15 minutes à 55°.

FIÈVRE A PAPATACII

La fièvre à papatacii qui présente, au point de vue clinique, de grandes analogies avec la fièvre jaune et le dengue, a en outre avec ces deux affections, ce caractère commun d'être déterminée par un virus invisible. Cette maladie sévit surtout en Bosnie, en Herzégovine, en Dalmatie et à Malte. C'est à Doerr, Franz et Taussig que nous devons le premier travail d'ensemble sur la fièvre à papatacū, et ce sont eux qui ont prouvé que cette maladie était transmise par un Phlébotomus. Ces auteurs démontrèrent en outre que le sang pris le premier jour de la maladie, et injecté à des hommes sains, transmettait la maladie, que ce sang pourtant virulent, ne contenait aucun organisme visible, que le virus qui y était contenu passait à travers les filtres les plus serrés car après filtration, on pouvait reproduire la maladie avec le filtrat.

Plus récemment Doer et Russ, ont fait les découvertes suivantes : Ils ont trouvé que le sang des malades était virulent pendant les premières vingt-quatre

heures, et que le virus disparaissait de la circulation périphérique au bout de 48 heures, après lesquelles le malade n'était plus dangereux. Le sérum d'un homme qui avait eu la fièvre à papatacii, deux ans auparavant, mélangé avec du sérum virulent, détruisait la virulence de ce dernier, et, du sérum d'un convalescent du 7^{me} jour atténuait un sérum virulent au point que celui-ci ne déterminait plus qu'une attaque légère. En ce qui concerne la filtration, ils trouvèrent qu'un sérum virulent dilué 5 fois avec du sérum physiologique passait avec difficulté à travers un filtre Reichel à grains serrés et aussi à-travers un filtre Pukall. Un dixième de centimètre cube du filtrat à travers Reichel produisait une attaque légère de fièvre, mais la même quantité prise dans le produit de la filtration sur Pukall était inoffensive.

Birt, médecin de l'armée anglaise, a repris les expériences de filtration du virus de la fièvre à Papatacii. Il constata d'abord que 1 c. c. 5 à 2 c. c. de sang *non filtré* d'un malade atteint de cette fièvre et inoculés sous la peau d'un homme sain déterminaient la maladie, l'incubation variant de 2 jours et 16 heures, à environ 5 jours. Il fit ensuite avec du sang *filtré* les expériences suivantes : 5 cm³ de sang étaient dilués avec 45 cm³ de sérum physiologique et filtrés à travers Chamberland F. Le filtre avait été au préalable éprouvé avec du micrococcus melitensis. Sept centimètres cubes du filtrat ainsi obtenu, contenant 0,7 cm³ du sang initial, furent injectés sous la peau d'un individu sain et déterminèrent une

attaque de fièvre typique, quatre jours et vingt et une heure après l'inoculation. Dans un autre cas : 6 cm³ du même filtrat, contenant 0,6 cm³ du sang initial, furent portés pendant une semaine à la température de 75 à 80° Farenheit et injectés ensuite sous la peau. Il en résulta, quatre jours et demi après, une attaque de fièvre mais cette fois *légère*. Le sang qui servait aux expériences était recueilli pendant les premières vingt-quatre heures de la maladie.

Les conclusions de Birt sont les suivantes :

1°) Le sang d'un malade atteint de fièvre à Papatacii est virulent pendant le premier jour.

2°) Le virus de la fièvre à Papatacii passe à travers le filtre Chamberland F.

3°) La période d'incubation varie de 3 jours seize heures à 7 jours.

4°) Le virus conserve son activité une semaine, in-vitro.

5°) La fièvre est transmise par un *Phlebotomus papatacii*.

6°) Le *Phlebotomus papatacii* est dangereux seulement sept à 10 jours après avoir piqué le malade.

VARIOLE

Casagrandi, dans le journal « Policlinico Roma » en 1908, expose les résultats de ses essais de filtration du virus varioleux. Cet auteur a fait des expériences de filtration avec Berkefeld W, Chamberland F, et Kitasato. Voici ce que dit Casagrandi :

« J'ai trituré le contenu des pustules varioleuses humaines, mélangé à du quartz, dans 3 mortiers, de porcelaine, d'agate et d'acier. Le produit de cette trituration fut dilué avec une solution de chlorure de sodium à 0,85 o/o, puis filtré à travers Berkefeld W, Chamberland F et Kitasato. J'ai favorisé la filtration en faisant avec une pompe à eau, un vide correspondant à 650^{mm} et j'ai ainsi obtenu le filtrat à travers Berkefeld W en 12 minutes, à travers Chamberland 32 minutes et à travers Kitasato en 3 heures. Les quantités respectives du filtrat obtenu pendant les temps indiqués étaient pour Berkefeld 125 cc. pour Chamberland 60 cc. et Kitasato 28 cc.

Ces bougies éprouvées avec le bacille prodigiosus ont donné un filtrat qui est resté stérile. Des ampoules de collodion contenant du bouillonensemencé avec ce même filtrat et placées pendant 4 jours dans le péritoine d'un lapin, restèrent de même stériles.

L'inoculation du filtrat sur la peau de jeunes chiens que je savais être très sensibles (par expérience personnelle : à l'infection vaccinale, et par celle de Sanfelix : à l'infection varioleuse), cette inoculation donna des résultats positifs. Elle fut faite au moyen de scarifications pratiquées avec une lancette.

Les deux chiens inoculés avec le filtrat Berkefeld présentaient dès le 2^e jour, sur les points inoculés, des parties surélevées et rosées, et au 3^e jour l'éruption pustuleuse était déjà manifeste. Les croûtes qui successivement se formèrent se maintinrent pendant 8 jours. Le produit d'une de ces pustules, recueilli et inoculé à d'autres chiens reproduisit la lésion pustuleuse au bout de 4 jours. On fit ainsi des inoculations en séries.

Un chien inoculé avec le filtrat Chamberland présenta au 3^e jour un seul des points scarifiés, rougi et surélevé. Ce point était déjà recouvert le 4^e jour d'un exsudat épais d'aspect lardacé, et au 5^e jour apparaissait une très belle pustule.

Un seul des chiens inoculés avec le filtrat Kitasato présenta, après trois jours, des points sacrifiés qui rougirent et se surélevèrent un exsudat lardacé. Vers le 5^e et le 6^e jour apparurent de petites pustules.

Avec les mêmes filtrats on inocula les cornées de divers lapins suivant la technique adoptée par Négri pour l'inoculation des filtrats de vaccine bovine. On fit 90 heures après l'inoculation l'examen à l'état de fragments d'épithélium et on constata la présence de cytoryctes dans les cornées inoculées avec le filtrat Berkefeld, puis

également dans celles inoculées avec les filtrats Chamberland F. et Kitasato. »

Casagrandi conclut que le virus varioleux contenu dans les pustules cutanées est filtrable à travers Berkefeld W. Chamberland F. et Kitasato.

Cet auteur ajoute que dans les examens microscopiques qu'il a fait des filtrats il a découvert de petits corpuscules arrondis, qu'il a pu colorer et qu'il pense être les agents spécifiques de la variole humaine. Ces corpuscules sont analogues à ceux décrits par Volpino. Casagrandi ajoute que ces corpuscules sont semblables à ceux qu'il a décrits dans le vaccin bovin. Cependant il ne prétend pas affirmer l'identité du virus varioleux et du virus vaccinique, « il faut attendre, dit-il, le résultat de nouvelles recherches ».

RAGE

Des divers parasites de la rage décrits par les auteurs à différentes périodes, il n'en est guère qu'un qui retienne aujourd'hui l'attention, c'est celui décrit par Negri.

Negri a découvert chez les sujets morts de la rage des *corpuscules* qui siègent dans les cellules pyrami-

dales de la corne d'Ammon, dans les cellules de Purkinje du cervelet, dans les grandes cellules des circonvolutions cérébrales. Ces corpuscules qui se présentent comme des inclusions protoplasmiques spéciales ont été décrits par cet auteur comme le parasite de la rage. C'est le Protozoaire spécifique de la rage. Ces inclusions n'existent pas dans le système nerveux des individus sains, ni dans celui des individus ayant succombé à une autre maladie. La découverte de Négri a été confirmée par Guarneri, Daddi, Celli et Blasi, Bosc, Bertarelli et Volpino, etc... Le parasite de la rage décrit par Négri présente une forme et des dimensions variables. Il est le plus souvent rond ou ovale avec un diamètre de 4 à 10^{mm}, mais il peut avoir des dimensions beaucoup plus considérables (20 à 25^{mm}) et aussi beaucoup plus réduites (1/2^{mm} à 1^{mm}), et même plus faibles encore. A côté de ces inclusions protoplasmiques le microscope montre, dans les cellules nerveuses, de fines granulations à peine visibles, se colorant, comme les inclusions ci-dessus décrites, en rouge par la méthode de Mann, et qui ne sont peut-être, dit M. Remlinger, que des modalités du même parasite.

Nous verrons plus loin ce qu'il faut penser de l'existence de ces corpuscules visibles au microscope et de leur passage à travers les filtres.

Le virus rabique est en effet un virus « filtrant » voici les principales expériences faites à ce sujet.

En 1903, Vestea annonce à l'académie médicale de Pise, qu'en filtrant une émulsion de virus rabique à tra-

vers la bougie Berkefeld sous une pression de 2 à 6 atmosphères, il a réussi quatre fois sur six à mettre en évidence le passage du virus (1). Avec Chamberland F la même expérience lui a donné également des résultats positifs quoique avec une fréquence moindre.

Bertarelli et Volpino réussirent également à obtenir avec la bougie Berkefeld un filtrat infectant. Mais ils échouèrent avec la bougie Chamberland F. En comparant la filtration à travers la terre d'infusoires et le papier, ils obtiennent un filtrat actif à travers un papier simple et un filtrat inactif à travers un triple papier.

Celli et Blasi ont également obtenu le passage du virus rabique à travers les bougies Berkefeld ordinaires.

Enfin M. Remlinger en 1904 a fait toute une série d'expériences sur la filtration du virus rabique.

Le virus rabique traversant très facilement la bougie Berkefeld V, cet auteur a recherché ce que devenait ce passage à travers, non plus une seule, mais plusieurs bougies V.

« Le cerveau d'un lapin ayant succombé au virus fixe est émulsionné finement dans 300 cc. d'eau, puis on fait traverser à cette émulsion la bougie Berkefeld V. On conserve la quantité de filtrat nécessaire à l'inoculation de 10 lapins. Le reste est passé à travers une deuxième bougie V. On conserve encore le liquide nécessaire à 10 trépanations. Le reliquat est filtré à travers une troisième Berkefeld V, et on trépane 10 nouveaux lapins. Les résultats obtenus ont été légèrement paradoxaux, 6 lapins du premier lot, 7 du deuxième et 9 du troisième

[1] M. Remlinger avait déjà antérieurement obtenu la filtration du virus rabique à travers Berkefeld.

ont pris la rage. Cette expérience, ajoute M. Remlinger, paraissait démontrer que l'organisme ultra-microscopique de la rage était arrêté dans les bougies, en raison moins de ses dimensions que du colmatage des parois filtrantes par les matières albuminoïdes de l'émulsion, et elle permettait de supposer que si on parvenait à supprimer ou tout au moins à diminuer ce colmatage, on pourrait faire traverser au virus rabique des bougies plus serrées que Berkefeld V. La dilution était le moyen le plus simple d'arriver à ce but. Elle a donné des résultats négatifs. Des résultats meilleurs ont été obtenus en usant au couteau une bougie Berkefeld V, en filtrant une première fois au travers l'émulsion rabique, puis en faisant traverser à ce filtrat une Berkefeld N ou W. La réussite de cette expérience n'est pas fatale. Il est bon de choisir des lapins jeunes et d'inoculer à chacun d'eux 1 cc. 1/2 de liquide. Et M. Remlinger cite les deux expériences qu'il a faites ainsi et où le passage du virus a pu être démontré, et il ajoute « La bougie Berkefeld W est une bougie extrêmement serrée. De ce qu'elle peut livrer passage au virus rabique, il s'ensuit que ce virus est notablement plus petit que nous ne l'avions cru ».

Que deviennent après ces expériences répétées et nettement positives de filtration du virus rabique, les corpuscules visibles au microscope et décrits par Négri comme le parasite de la rage ? Schuder, après avoir constaté qu'un filtre qui retenait le vibrion cholérique laissait passer le virus rabique, concluait que le parasite

décrit par Négri n'est pas l'agent spécifique de la rage, car du fait de sa filtration, il présente des dimensions si faibles qu'il est invisible avec les microscopes ordinaires. Celli et Blasi prétendent que si les formes volumineuses et moyennes du parasite de Négri doivent être retenues sur les filtres, il peut n'en être plus de même pour les formes petites. Et ces auteurs ont retrouvé des inclusions protoplasmiques identiques chez des animaux qui avaient succombé à une rage déterminée par du virus filtré. Negri lui-même a fait des constatations analogues.

M. Remlinger sans prendre parti dans la question fait observer contre l'hypothèse parasitaire des corpuscules de Négri, l'absence de corrélation entre leur distribution et celle du virus rabique.

« C'est dans le bulbe et la protubérance qu'existe, la chose est classique, dit cet auteur, la plus grande quantité de virus. Or à ce niveau les parasites sont absents pour la majorité des auteurs, extrêmement rares pour les autres. Au contraire ces corpuscules se rencontrent surtout dans les cellules pyramidales de la de la corne d'Ammon et de l'écorce cérébrale, dans les cellules de Purkinga du cervelet, là où le virus rabique est relativement peu abondant.

« Une petite particularité de nature à faire admettre par contre, ajoute M. Remlinger, que les « microbes invisibles » constituent bien un groupe spécial et que la rage doit figurer dans ce groupe, c'est la façon identique dont ces micro-organismes d'une part, le virus ra-

tique de l'autre, réagissent à la température ». MM. Marchoux et Simond ont fait remarquer que les organismes ultra-microscopiques offraient tous à la chaleur une résistance très faible. Nous avons donné le détail de cette particularité dans le premier chapitre de cette thèse.

COQUELUCHE — OREILLONS — SCARLATINE

La coqueluche, la scarlatine, les oreillons, sont des affections dont les microbes ne semblent pas être des germes « invisibles » — tout au moins pour la coqueluche et les oreillons. Ces germes, cependant, passent à travers des filtres assez serrés comme ceux de Berkefeld. Nous citons, à titre d'indications, en attendant de nouvelles précisions au sujet de la bactériologie de ces trois maladies, les expériences de filtrations qui ont été faites.

Coqueluche. — Casagrandi a isolé avec une très grande constance, dit-il, dans les crachats des coquelucheux, une bactérie semblable au bacille de Pfeiffer, et qui répond aux caractères du B. Pertussis de Bordet et Gengou. Casagrandi a filtré à travers Berkefeld W les crachats de coquelucheux. Après avoir broyé et centrifugé le filtrat on trouve au fond de l'éprouvette de

petits corpuscules infiniment petits tendant à se réunir en amas et que l'on peut mettre en évidence par la coloration rouge carmin avec la Giemsa. Ce sont les mêmes petits corpuscules que l'on trouve dans les crachats non filtrés. L'auteur ne se prononce pas sur la nature ni sur le rôle de ces corpuscules, par rapport à l'étiologie de la coqueluche.

Oreillons. — A propos du virus des oreillons Saverio Granata a fait l'expérience suivante :

De la salive a été prélevée sur des malades atteints d'oreillons, broyée soigneusement dans des mortiers de porcelaine, d'agate et d'acier, convenablement diluée et filtrée sur bougie Berkefeld. Des inoculations de ce filtrat ont été faites au lapin dans une veine, sous la peau et en pleine grande parotide.

Les inoculations intra-veineuses et intra-glandulaires ont causé une élévation de température 40° qui s'est maintenue pendant 3 jours. Avec de la salive normale : rien.

L'inoculation sous-cutanée et intra-glandulaire a déterminé une tuméfaction durable (sous-cutanée, elle a duré au moins deux semaines). Au-dessus de la parotide gonflée, la peau restait bien mobile ; aucune trace de suppuration. Lorsqu'on laisse le filtrat à la glacière pendant plusieurs jours, l'inoculation ne donne plus qu'un très léger engorgement de la parotide comme s'il y avait une atténuation du virus.

Une parotide expérimentalement infectée a donné, en cultures, un microbe qu'il était aisé de rapporter à la

flore normale de la bouche du lapin. De plus dans l'eau de condensation des tubes de gélose on a trouvé « de petites gouttelettes transparentes, punctiformes qui transportées dans de nouveaux milieux ne s'y sont pas reproduites ». Après coloration on trouve dans ce matériel, dit Saverio Granata, « des granulations fines isolées ou par couples, de l'ordre de grandeur du virus de la peste bovine ».

En résumé ces expériences demandent à être confirmées.

Scarlatine. — « Dans le dépôt lingual, les voies lymphatiques de la peau et les ganglions scarlatineux il existe, dit M. Bernhardt, un virus, lequel inoculé à des singes inférieurs engendre, après une incubation variable, un syndrome morbide ressemblant dans ses principaux traits à la scarlatine humaine ». M. Bernhardt a filtré ces produits scarlatineux à travers Berkefeld. Le filtrat inoculé à des singes, aurait reproduit la scarlatine deux fois sur quatre. M. Levaditi, dans une étude de 1912 sur l'étiologie de la scarlatine, se demande, si, à la suite de ces expériences, le microbe de la scarlatine ne serait pas de l'ordre des microbes « invisibles ». Il est cependant certain qu'avant de se prononcer il convient, comme dit M. Levaditi, d'attendre le résultat de nouvelles expériences.

FIÈVRE APHTEUSE

L'étude du micro-organisme de la fièvre aphteuse a été faite par Loeffler en 1898. Voici ce que dit cet auteur, analysé par M. Jules Lesage :

« A priori on peut supposer que les petites dimensions d'un microbe puissent être une cause de difficulté pour sa découverte. J'ai étudié à ce point de vue la fièvre aphteuse.

« Lorsque j'ai commencé mes travaux il importait de chercher ce qu'il y avait de vrai dans les travaux publiés antérieurement. On trouve le virus dans les vésicules qui se produisent chez le bœuf et le porc. En ponctionnant aseptiquement ces vésicules on ne rencontrait jamais de germes, et cependant une très faible quantité de liquide ainsi prélevée produisait la maladie, soit qu'on l'inoculât sur la muqueuse buccale soit qu'on l'injectât dans le sang. Il était donc vraisemblable qu'on se trouvait en présence d'un micro-organisme inconnu. Or en filtrant le liquide vésiculaire sur terre d'infusoires on constatait que la lymphe filtrée produisait la fièvre aphteuse typique. Il s'agissait donc d'en déterminer l'origine et l'on pouvait penser à deux choses : ou à un poison soluble ou à un germe assez petit

pour passer au filtre. Il a été très difficile de trancher cette question.

« S'il était possible de reproduire la maladie, après des filtrations et des injections alternatives et répétées, il était certain qu'on avait affaire à un ferment figuré. Or après plusieurs filtrations et injections successives on constata une remarquable atténuation dans la virulence du poison. Il était donc impossible d'arriver à un résultat en suivant cette voie, et il était nécessaire de trouver une autre méthode.

« Nous avons atteint notre but en procédant de la manière suivante : nous avons prélevé 1/50^e du contenu de la vésicule aphteuse d'un porc. Ce liquide dilué était ensuite filtré, puis injecté au veau directement dans le sang. Sur l'une des vésicules produites chez le veau inoculé on prélevait un échantillon analogue que l'on soumettait aux mêmes préparations que le précédent. En admettant que chaque vésicule contienne 3 cm de lymphé, chaque inoculation en représentait 1/150^e de centimètre cube.

« On a effectué ainsi six passages successifs avec la même lymphé filtrée.

« Cette série établit avec une grande probabilité que le virus aphteux est un agent vivant qui se multiplie dans le corps de l'animal malade. On peut en effet admettre, comme nous l'avons dit, sans exagération, que l'animal rendu malade par l'injection du premier 1/50 de centimètre cube de lymphé filtrée, a produit, dans ses vésicules, 3 c. c. de lymphé, et en outre que la

totalité de la lymphe injectée se trouve excrétée dans ces 3 c. c., et y représente $1/50$ de centimètre cube. Par conséquent le $1/50$ de lymphe filtrée, injectée à l'animal suivant représentera $\frac{1 \text{ c. c.}}{150 \times 50}$ de la lymphe originelle. Le deuxième sujet produit encore 3 c. c. de lymphe, dont on injecte, à un 3^{me}, $1/50$ de centimètre cube, où la lymphe originelle est représentée par $\frac{1 \text{ cm. 3}}{150 \times 150 \times 50}$, au 4^{me} par $\frac{1}{150^3 \times 50}$, au 5^{me} par $\frac{1}{150^4 \times 50}$, au 6^{me} par $\frac{1}{150^5 \times 50}$. Le calcul effectué montre que le sixième animal a reçu moins d'un deux-billionièmes ($1/2 \times 390.625.000.000$, d'après l'auteur) de la lymphe originelle. Or, d'après les expériences antérieures de la commission $\frac{1 \text{ c. c.}}{50000}$ n'est plus actif.

« Le virus s'est donc reproduit dans le corps des animaux traités avec la lymphe filtrée.

« Il est impossible d'admettre qu'un poison agisse à cet état de dilution extrême ; il faut penser au contraire que nous nous trouvons en présence d'un microorganisme producteur de la fièvre aphteuse. Ce microorganisme a certainement des dimensions extrêmement faibles au-delà des limites de la visibilité. »

Les essais de culture tentés par M. Lœffler sur les milieux usités ont échoué. Ce microbe ne cultive qu'un milieu animal. Le lait aussi bien

que le milieu Martin employé par Nocart et Roux pour la culture du microbe de la péri-pneumonie, n'ont pas donné de meilleur résultat que les autres milieux de laboratoire.

VACCINE

Le virus vaccin est également un germe inconnu, invisible et filtrant. M. Remlinger, résume, de la façon suivante, les travaux effectués par différents auteurs et par lui, sur la filtration de la vaccine :

« Négri emploie la pulpe vaccinale directement recueillie sur la génisse ; il l'incorpore intégralement à 10 ou 12 fois son poids d'eau distillée et la passe à travers Berkefeld V. Il scarifie la cornée d'un lapin et met en contact pendant une dizaine d'heures avec cette scarification un petit tampon d'ouate imbibée du filtrat. Il obtient une pustule pypique. L'examen microscopique pratiqué vers la 60 ou 70^e heure, révèle la présence des corpuscules de Guanieri. On peut à l'aide de ces pustules cornéennes, reproduire la réaction sur d'autres cornées et, sur la peau du veau, la pustule typique. Deux fois Negri est parvenu à obtenir directement, avec

le filtrat, la pustule cutanée sur la mamelle de la vache.

« Dans les expériences que nous avons entreprises avec M. Osman Nouri, nous nous sommes préoccupés de démontrer par l'inoculation ultérieure d'une pulpe très active, la nature vaccinale des éruptions observées. Deux grammes de pulpe fraîche sont incorporées très intimement, le plus tôt possible après la récolte chez la génisse, à 50 gr. d'eau stérile.

« L'émulsion est filtrée à travers Berkefeld V et du filtrat inoculé au lapin et au cobaye par frottement sur la peau fraîchement rasée, en évitant avec grand soin toute entaille cutanée. Au bout de 4 ou 5 jours on observe une éruption pustuleuse de tous points semblable à l'éruption obtenue avec la pulpe ordinaire. La période d'incubation seule diffère. Celle-ci, de 2 ou 4 jours avec la pulpe, est de 4 ou 5 jours avec le filtrat. L'éruption observée est bien une éruption vaccinale, car le lapin et le cobaye inoculés ensuite avec une pulpe très active, demeurent indemnes.

« Siegel est arrivé à trois reprises à infecter le lapin à l'aide de pulpe vaccinale fraîche ayant traversé la bougie Chamberland. Toutefois la forte pression dont il se servait (10 à 15 atmosphères) impose des réserves quant aux conclusions à tirer de ses expériences.

« Santori, Vincent, Rouget ont échoué dans leurs tentatives de reproduction directe de la pustule vaccinale par inoculation du filtrat. Pour obtenir un résultat positif il faut, semble-t-il, opérer avec une dilution étendue de pulpe vaccinale fraîche et non glycinée, inoculer

une grande quantité de filtrant à un nombre considérable d'animaux, et à l'aide d'un dispositif approprié (suture des paupières par dessus le tampon imbibé, frottement énergique de la peau rasée) assurer un contact intime et prolongé du filtrat avec la surface à inoculer. Même si on se place dans les meilleures conditions, le virus vaccinal est retenu partiellement dans la bougie et on peut avoir un certain nombre de résultats négatifs.

« Un moyen indirect de démontrer le passage du virus vaccinal à travers les bougies consiste à inoculer le filtrat sous la peau d'un animal réceptif et à vérifier consécutivement l'immunisation de cet animal contre la vaccine. Cette expérience a été réalisée pour la première fois en 1903 chez le chien par Casagrandi. Cet auteur filtre du virus vaccinal à travers une bougie Chamberland et il injecte ce filtrat sous la peau d'un chien. L'animal a acquis l'immunité vis-à-vis d'une pulpe fraîche très active.

« Nous avons reproduit cette expérience avec Osman Nouri de la façon suivante : cinq grammes de pulpe fraîche sont incorporés intimement à 100 grammes de solution physiologique de NaCl. L'évulsion est filtrée par aspiration à travers Berkefeld V et le filtrat injecté sous la peau d'un lapin ou d'un cobaye. Six jours plus tard, lorsque l'immunité a eu le temps de s'établir, l'animal est inoculé sous la peau rasée avec un vaccin très actif. Il ne se produit aucune éruption.

« Rouget a obtenu des résultats à peu près identiques. Sur dix séries d'expériences sur la gémisse il a obtenu

quatre fois des résultats positifs de filtrat Berkefeld V ou W, inactif en scarifications épidermiques, était inoculé sous la peau à la dose de 40 cm³ environ. Huit jours plus tard, l'animal était soumis à une inoculation d'épreuve avec de la pulpe glycérinée servant à inoculer d'autres vaccinifères comme témoins et on constatait que la génisse avait acquis l'immunité.

« M. Rouget est également arrivé à donner l'immunité à la génisse en lui insérant sous la peau des sacs de collodion renfermant le filtrat.

« De Wacle et Sugg ont fait des expériences analogues avec Chamberland F. Ils ont obtenu des résultats négatifs.

« Cette dernière série de faits est à rapprocher d'expériences analogues sur la filtrabilité du virus rabique. Le passage du virus rabique à travers les bougies se démontre à la fois par l'inoculation directe du filtrat sous la dure-mère du lapin et par l'injection sous la peau de doses massives qui préservent l'animal contre l'épreuve sévère de la tréformation avec le virus fixe. L'immunisation ainsi conférée est bien le fait du virus et non de la toxine, car la stérilisation par l'éther fait perdre au virus filtré ses propriétés immunisantes et l'injection sous-cutanée du virus ayant traversé une bougie à mailles plus serrées que Berkefeld V (marque W) ne donne aucune immunité. On paraît donc peu fondé à prétendre que l'immunité vaccinale conférée par l'inoculation sous-cutanée du filtrat est le fait non du virus ayant traversé la bougie, mais d'une toxine hypothétique.

« Casagrandi a réalisé sa filtration du virus vaccinal à travers Berkefeld W, Chamberland F et B, les bougies Kitasato et Silberchmidt. Le filtrat produit sur la peau du chien des lésions qu'on ne peut distinguer des lésions vaccinales et sur la cornée du lapin une ulcération identique à celle que produit le vaccin non filtré. L'une et l'autre de ces deux lésions sont transmissibles en série. Le germe vaccinal aurait une résistance supérieure à celle des autres organismes ultra-microscopiques connus. Sa vitalité dans les filtrats se rapprocherait beaucoup de celle de la pulpe elle-même. Le filtrat devient inactif après une heure à 80° et 3 minutes à 100° ; à 40° il résiste plus de 24 heures. Les filtrats maintenus à l'obscurité et à la température ordinaire sont encore actifs sur la cornée du lapin au bout de 7 mois et sur la peau du chien au bout de 3 mois.

« L'examen microscopique de la pulpe et du filtrat ne montre aucun germe qui puisse être considéré comme l'agent du vaccin.

« Casagrandi fait remarquer en terminant qu'étant donné sa grande résistance il est très probable que cet agent n'est pas un Protozoaire. »

Voici comme complément à ce qui précède au sujet du passage du virus vaccin à travers les bougies filtrantes une série de dix expériences qui ont été faites, à l'occasion de notre thèse, et obligeamment communiquées par M. Wurtz et M. Camus, de l'Institut Supérieur de vaccine :

I

EXPÉRIENCES DE FILTRATION DU VACCIN SUR BOUGIE
D'ALUMINE

Vaccin. — Vaccin provenant de 10 lapins (N° 210 à 220), la pulpe a été broyée avec de l'eau glycinée dans l'appareil Latapie, puis au mortier et tamisé. Ce vaccin a été dilué au 1/100 environ.

Inoculation. — 2 centimètres cubes de liquide filtré sur la bougie ont été inoculés à un lapin gris N° 222 mâle, 2 k. 510. Une surface de 228 cent. carrés de la peau du dos préalablement rasée a été inoculée par grattage à la pipette. Cinq jours après cette inoculation on pouvait compter sur la surface du dos six pustules. Ces six pustules récoltées ont été inocuées après trituration à un autre lapin et ont donné une éruption confluyente.

II

Vaccin. — Même préparation de vaccin que pour l'expérience I.

Inoculation. — Un lapin femelle N° 223 pesant 2 k. 500 a été inoculé sur la surface cutanée du dos en trois endroits :

1° Sur une surface antérieure de 65 cent. carrés on a inoculé 0 cc, 3 de la dilution de vaccin avant filtration ;

2° Sur une surface moyenne de 70 cent. carrés on a inoculé 0 cc, 3 de la même dilution filtrée sur papier (filtre Laurent) ;

3° Sur une surface postérieure de 63 cent. carrés on a inoculé 0 cc, 3 du même vaccin filtré sur bougie d'alumine.

Cinq jours après l'inoculation les surfaces antérieure et

moyenne étaient recouvertes d'une éruption d'éléments congluents sur la surface postérieure avait évolué seulement six éléments.

III

Vaccin. — Même origine que pour les expériences précédentes.

Inoculation. — Un lapin femelle n° 230 de 2 k. 820 on a inoculé :

1° sur une surf. antérieure de 60 cent. carrés, Occ. 3 une dilution de vaccin filtrée sur papier (filtre Laurent).

2° sur une surface médiane de 65 cent. carrés a été conservée vierge de toute inoculation.

3° Sur une surface postérieure de 65 cent. carrés, 000.3 d'une dilution de glycérine dans l'eau ordinaire.

Après cinq jours l'animal présentait une éruption confluente sur la surf. antérieure, aucun élément sur la surf. moyenne et un élément adhérent sur la surf. postérieure.

IV

Vaccin. — Même préparation de vaccin que pour les expériences précédentes,

Inoculation. — Un lapin femelle n° 231 du poids de 3 k. 130, a été inoculé.

1° Sur une surface antérieure de 48 cent. carrés avec une dilution d'eau glycinée.

2° Une surface médiane de 35 cent. carrés a été réservée inoculation.

3° Une surf. postérieure de 42 cent. carrés avec occ. 3 du vaccin filtré sur bougie d'alumine.

Six jours après les inoculations on notait :

1° Aucune éruption sur la surf. antérieure et sur la surface médiane.

2° Sur la surf. postérieure, 4 éléments bien développés,

V

Vaccin. — Même préparation de vaccin que pour les expériences précédentes.

Inoculation. — Un lapin mâle n° 233 du poids de 3 k. 200 a été inoculé sur une surface dorsale de 173 cent. carrés avec 2 cent. cubes du liquide filtré sur bougie d'alumine.

Six jours après la surface d'inoculation existait 41 éléments dont quelques-uns très beaux et d'autres assez petits.

VI

Vaccin. — Vaccin de génisse broyé avec de l'eau salée physiologique au moyen de l'appareil Latapie puis tamisé.

Inoculation. — Un lapin femelle n° 233 du poids de 2 k. 900 a été inoculé 1° sur une surf. antérieure de 28 cent. carrés avec la dilution de vaccin filtré sur papier (filtre Laurent). Occ, 3.

2° Sur une surf. médiane de 61 cent. carrés avec occ. 3 filtré sur bougie Garros.

3° Sur une surface postérieure de 70 cent. carrés avec 3 cc. de la dilution de vaccin filtrée sur bougie Berkefeld.

Six jours après l'inoculation on a pu compter sur la surface antérieure 207 éléments et sur le carré moyen 3 éléments sur la surf. postérieure 9 éléments dont 6 très beaux et 3 plus petits.

VII

Vaccin. — Même vaccin que pour l'exp. précédente.

Inoculation. — Un lapin n° 238, mâle du poids de 2 k. 320 a été inoculé sur une surface cutanée de 228 cent. carrés avec 2 cc. de dilution de vaccin filtré sur bougie Garros ; après 6 jours sur cette surface on a compté 23 belles pustules.

VIII

Vaccin. — Même vaccin que précédemment.

Inoculation. — Un lapin n° 239 du poids de 2 k. 150 on a inoculé sur la surface dorsale une dilution du vaccin de génisse broyé dans l'eau salée et filtré sur papier (filtre Laurent).

Une éruption presque confluyente formée de belles pustules s'est produite sur une surface d'inoculation.

IX

Vaccin. — Même vaccin que précédemment.

Inoculation. — Un lapin n° 240 femelle du poids de 2 k. 270 a été inoculé sur une surface dorsale de 180 c. carrés avec une dilution de vaccin filtré avec bougie d'alumine.

Après cinq jours on a compté six pustules sur la surface d'inoculation.

X

Vaccin. — Vaccin de génisse filtré sur papier (filtre Laurent).

Inoculation. — Un lapin n° 241, femelle du poids de 2 k. 550 a été inoculé sur une surface dorsale avec $3/10$ de cent. cubes de ce liquide filtré.

Cinq jours après sur la surface d'inoculation on a pu constater la présence de 180 pustules.

Il résulte de ces expériences une confirmation de ce fait que le virus vaccin passe à travers les bougies filtrantes (comme nous l'avons déjà vu précédemment), à pores très serrées, telles que les bougies Berkefeld, Garros etc. . . et en outre que ce virus passe en petites quantités et que la plus grande partie en est retenue, puisque le liquide filtré (2 cent. cubes d'une solution à 1/100^e de pulpe normale) n'a donné que 6, 6, 1, 4, 41, 3, 9, 23, et 5 éléments.

« Peut-on déduire de ce fait, dit M. Wurtz, que si la plus grande partie des germes resté sur le filtre c'est que ces éléments sont de dimensions différentes, et que les plus petits sont en minorité ? Cela est possible. »

Après les expériences de MM. Chauveau citées au début de cette thèse et effectuées sur la vaccine, comme expériences types, pour écarter, dans les maladies à microbes « invisibles » l'hypothèse de toxines ou d'une matière chimique en dissolution, résultats sur lesquels nous ne reviendrons pas, nous citons ici de nouvelles expériences effectuées par cet auteur sur la nature du virus vaccin. — « J'ai cherché à résoudre ces questions, dit M. Chauveau, en soumettant isolément au critère de l'expérimentation physiologique les principes qui entrent dans la composition de la sérosité vaccinale : d'une part, le *sérum*, contenant, avec l'*albumine* qui en forme la base, toutes les autres substances solubles ; d'autre part, les *éléments solides*, c'est-à-dire les *leucocytes* et les *granulations élémentaires*, qui sont tenues en suspension dans la sérosité.

« Pour étudier l'activité propre du sérum vaccinal, il fallait l'obtenir entièrement dépouillé des particules solides dont il est chargé. C'était d'une grande difficulté. En effet, les deux procédés employés jusqu'à ce jour pour arriver à ce résultat, la filtration et la décantation, cette dernière surtout, permettent d'enlever ses leucocytes au plasma. Mais ce fluide retient toujours les éléments solides les plus nombreux, c'est-à-dire les granulations élémentaires. Celles-ci, à l'instar des particules de tannate de fer qui colorent l'encre, ne se déposent jamais complètement dans les couches profondes du milieu ambiant, et passent à travers tous les filtres. Cependant l'emploi de la décantation, tout imparfait que soit ce moyen, m'a permis de constater un fait important ; c'est que le sérum absolument privé de leucocytes est tout aussi virulent que celui qui en est chargé. Voici comment a été faite cette expérience ;

« De la sérosité vaccinale est mélangée avec dix fois son poids d'eau, afin d'en diminuer autant que possible la densité et la viscosité, sans altérer sensiblement son activité virulente. Grâce à cette précaution, le vaccin, placé dans une petite éprouvette et abandonné vingt quatre heures à lui-même, dans un repos complet, laisse déposer au fond du vase la plupart de ses leucocytes, sinon tous. On s'en assure en aspirant, avec un tube capillaire, la couche superficielle, qu'on fait passer ensuite sur le porte-objet du microscope pour la soumettre au plus minutieux examen. Si la gouttelette ainsi examinée se montre absolument dépourvue de leucocytes, on peut

s'en servir pour pratiquer des inoculations cutanées, qu'on multiplie autant que possible. C'est une expérience que j'ai eu l'occasion de répéter assez souvent. Les résultats en ont été constamment positifs.

« Ainsi, les leucocytes ne constituent pas les agents essentiels de la virulence. Ils peuvent partager cette propriété avec les autres éléments du liquide vaccinal. Mais ne la possèdent point exclusivement. Leur influence, dans l'activité de ce liquide est donc aussi effacée que possible. Ils n'ajoutent ni n'enlèvent rien à cette activité. En est-il de même des autres particules solides, c'est-à-dire granulations ? C'est une question à laquelle les expériences dont il me reste à parler permettent de donner une réponse catégorique.

« J'ai réussi, en effet, à obtenir la sérosité vaccinale absolument privée de tous ses corpuscules solides, y compris les granulations les plus fines. C'est en utilisant le phénomène bien connu de la diffusion.

« De la sérosité vaccinale est introduite au fond d'une très petite éprouvette. On a soin, pendant l'opération, d'éviter que le liquide ne touche les parois du vase au-dessus du niveau que ce liquide doit atteindre. Puis on verse dessus une couche distillée, avec toutes les précautions voulues pour qu'il ne se produise aucun courant capable de déterminer le mélange mécanique des deux fluides. De cette manière, on a dans l'éprouvette une colonne liquide formée de deux couches, de densité et de composition différentes : une supérieure, composée d'eau pure, une inférieure, constituée par le vaccin,

et renfermant, avec les éléments solides de celui-ci, toutes les substances dissoutes qui entrent dans la composition de la sérosité vaccinale. Si on abandonne l'éprouvette à elle-même dans un milieu à température constante, où le liquide, mis à l'abri de l'évaporation, soit maintenu dans un repos complet, les corpuscules en suspension dans la couche inférieure, y restent confinés tant qu'aucune action mécanique ne les sollicite à monter dans la couche supérieure. Mais il n'en est pas de même des substances albumineuses et salines dissoutes dans la sérosité. En vertu des lois de la diffusion, ces substances passent dans la couche aqueuse, les unes plus vite, les autres moins, suivant leur pouvoir diffusible. Et le transport s'effectue sans que les particules solides y prennent part, le mouvement atomique qui constitue la diffusion est incapable d'entraîner par lui-même d'autres éléments que ceux sur lesquels l'eau exerce son affinité moléculaire.

« Quand il s'est écoulé le temps nécessaire pour que la diffusion ait amené jusqu'à la surface de l'eau une notable proportion des principes qui constituent la sérosité vaccinale, on retire le liquide couche par couche en l'aspirant à l'aide de fins tubes capillaires mis en contact, par une de leurs extrémités avec la surface liquide. On obtient ainsi, dans les premiers tubes, tous les éléments solubles qui forment la sérosité vaccinale ; dans les derniers, ces mêmes éléments, plus les corpuscules en suspension, c'est-à-dire le vaccin complet plus ou moins dilué. Les deux sortes de liquides peuvent

alors être inoculés comparativement, soit sur le même sujet, soit sur des sujets différents.

« C'est une expérience que je viens de faire un grand nombre de fois sur l'enfant, le cheval et la génisse. En général, j'ai employé du vaccin soumis à la diffusion pendant quarante-huit heures, sous une couche d'eau de 4 millimètres. Pour l'inoculation du liquide simplement plastique, j'ai utilisé seulement le contenu du premier tube recueilli, parfois aussi celui du deuxième, afin d'écarter le plus possible les chances de mélange accidentel avec le liquide chargé de particules solides. Ce mélange, en effet, ne peut être complètement évité dans les régions qui avoisinent le point de contact des deux liquides. C'est le résultat naturel des changements de densité que la diffusion détermine dans ces liquides, changements qui ne sauraient s'opérer sans qu'il en résulte un déplacement dans la position respective des couches hétérogènes superposées. Si léger et si lent que soit ce déplacement, il est capable d'opérer dans une certaine mesure de ces couches, ce qui fait que la diffusion ne s'accomplit jamais sans que quelques éléments solides remontent dans le liquide supérieur, plus ou moins haut, suivant la durée du phénomène.

« Les inoculations pratiquées dans ces conditions ont été aussi démonstratives que possible. »

Ainsi donc ni les toxines, hypothétiques, ni les leucocytes, ni les granulations ne peuvent être considérés comme les agents efficaces de la vaccine. Le virus en est inconnu. Il passe à travers les bougies filtrantes,

mais il ne passe qu'en petites quantités, comme nous l'avons déjà indiqué. Nous avons vu également ce que pensait M. Wurtz de ce fait.

CHAPITRE III

Maladies spéciales aux animaux et aux végétaux

PÉRIPNEUMONIE

La péripneumonie, affection des bovidés, localisée au poumon et à la plèvre de ces animaux, caractérisée par une exsudation fibrino-séreuse dans le tissu cellulaire intra-lubulaire et sous-pleural, est causée par un microbe *à la limite* de la visibilité. Ce microbe a fait l'objet d'une étude spéciale de M. Dujardin-Beaumetz en 1900.

Pasteur en 1882, puis MM. Nocard et Roux essayèrent sans succès de cultiver le microbe de la péripneumonie. Ce n'est que, lorsque en 1896, MM. Metchnikoff, Roux et Salembeni eurent indiqué une nouvelle méthode de culture *in vivo* avec des ampoules de collodion, que MM. Nocard et Roux, avec leurs collaborateurs MM. Borel, Salembeni et Dujardin-Beaumetz, réussirent à cultiver le microbe de la péripneumonie.

On sait en quoi consiste cette culture *in vivo*. On introduit dans le péritoine d'un animal, après laparatomie, une de ces petites ampoules de collo-

dion contenant du bouillon ensemencé avec le microbe que l'on étudie, les ampoules sont stérilisables par la chaleur sans perdre leur souplesse. Les animaux supportent très bien la présence de ces corps étrangers dans leur cavité abdominale.

Au bout de quelque temps on sacrifie l'animal, on recherche l'ampoule, généralement entourée de tissu fibreux, dans la cavité péritonéale. On enlève cette enveloppe fibreuse et on peut alors puiser dans le sac avec une pipette, et retirer le liquide que l'on veut étudier.

MM. Nocard et Roux, utilisant ce procédé pour le microbe de la péripneumonie, ensemencèrent un sac avec de la sérosité péripneumonique aseptiquement et purement recueillie; le laissèrent quinze jours dans la cavité péritonéale d'un lapin, puis sacrifièrent l'animal. Le liquide retiré du sac était albumineux, opalescent et renfermait une grande quantité de petits points réfringents, mobiles, mais de si faibles dimensions qu'on ne pouvait leur déterminer une forme, même avec les plus forts grossissements.

Comme contrôle, un autre sac, mais non ensemencé, avait été placé dans la cavité péritonéale comme le précédent, et le liquide, après quinze jours, était albumineux, mais parfaitement clair.

C'était donc l'*opalescence* qui différenciait les deux sacs et elle apparaissait surtout par comparaison. Ces expériences furent répétées plusieurs fois avec les mêmes résultats.

L'inoculation à une génisse de quelques gouttes du

liquide louche déterminera une infiltration œdémateuse, analogue à celle que produit l'inoculation de la sérosité pulmonaire d'un animal malade. De plus les animaux inoculés avec ce liquide opalescent acquéraient l'immunité.

Il s'agissait donc bien d'une véritable culture du microbe de la péripneumonie.

Après ces résultats de culture *in vivo*, MM. Nocard et Roux, et Dujardin-Beaumetz essayèrent alors d'obtenir des cultures *in vitro*, cultures qui, jusqu'à ce jour, n'avaient pas donné de résultats précis. Après de nombreux essais et recherches, ils arrivèrent à trouver le milieu favorable, qui est *un bouillon peptonisé spécial additionné de sérum*.

Ces auteurs ne se servaient pas pour leurs expériences des peptones du commerce, qui ne donnent que rarement des résultats positifs pour les cultures de péripneumonie, mais de l'eau peptonisée employée par le Dr L. Martin pour la production de la toxine diphtérique. A cette eau peptonisée ils ajoutent du sérum normal de bœuf, dans la proportion de 6 à 8 o/o. Si, au lieu de sérum normal, on employait du sérum stérilisé par chauffage discontinu à 58°. le bouillon deviendrait trouble au-delà de la proportion de 5 o/o, et par conséquent gênerait l'expérience.

Le bouillon ainsi obtenu, avec ce sérum normal est stérilisé par filtration sur bougie Chamberland et réparti en matras ou en tubes, et éprouvé pendant 48 heures à l'étuve.

Ce bouillon est ensemencé avec une trace de la sérosité recueillie dans les cavités taillées, au moyen d'un scalpel, dans le poumon hépatisé d'un animal mort de péricapnémie. Cette sérosité est obtenue pure par un passage à travers les bougies filtrantes car, comme nous le verrons plus loin, le microbe de la péricapnémie passe à travers les filtres qui retiennent tous les microbes connus.

Ainsi ensemencé, le bouillon donne, au bout de 2 à 3 jours à l'étuve à 37°, une opalescence qui apparaît mieux par comparaison avec un autre tube témoin de bouillon sérum. On peut, suivant le conseil de M. Dujardin-Beaumetz, la mettre en relief de bonne heure en faisant traverser le tube ensemencé par un faisceau lumineux qui a traversé auparavant un écran percé d'une seule ouverture. En agitant le tube on aperçoit les ondes soyeuses. C'est un phénomène du même ordre que l'éclairage par un rayon de soleil, pénétrant dans une chambre obscure, des poussières en suspension dans l'air, poussières qui sont invisibles à la lumière diffuse.

Si on examine une goutte du liquide opalescent au microscope (en goutte suspendue ou mieux sous une lamelle), on n'aperçoit, même avec les plus forts grossissements (1500 à 2000 diamètres), « que de très fines granulations, mobiles, agitant par contact les particules albumineuses en suspension dans le bouillon. Dans une préparation faite avec une goutte du tube témoin, les mêmes particules sont annexés d'un mouvement brownien, mais ce mouvement est moins étendu que celui

observé dans l'examen de la culture. »

Sur milieu solide, la gélatine ne pouvant pas servir de milieu de culture, car le microbe de la péripneumonie ne cultive qu'à une température *supérieure à 30°*. Le milieu employé par M. Dujardin-Beaumetz fut le bouillon peptonisé préparé par la méthode du docteur L. Martin et « additionné de 15 grammes de gélose par litre, chauffé à l'autoclave à 115°, filtré, réparti en tubes et incliné. Quand la gélose est bien adhérente au verre, on retire au moyen d'une pipette, l'eau de condensation rassemblée dans le fond du tube, et on la remplace par un 1/2 c. c. environ de sérum normal filtré. Les tubes sont ensuite inclinés pendant 24 heures afin que le sérum s'étale à la surface du milieu solide et imbibe la gélose. On les éprouve à l'étuve. Cette gélose nutritive est aussi transparente que de la gélatine ».

Ensemencés avec une goutte de sérosité péripneumonique ces tubes montrent après 3 ou 4 jours d'étuve, des colonies microbiennes tellement fines qu'on ne peut les distinguer qu'à la loupe et au jour frisant. Mieux vaut les examiner sur la platine du microscope à un faible grossissement.

On voit à travers la gélose de très petites colonies réfringentes, dit M. Dujardin-Beaumetz, transparentes, comparable à des gouttelettes de rosée, rarement confluentes et dont le diamètre mesure environ 0^{mm}2, à partir du cinquième jour de la culture les colonies prennent une forme caractéristique. Au centre apparaît une zone bien délimitée, ronde, mesurant 6 ^{mm} 2 de diamètre,

granuleuse et de couleur brunâtre se présentant sous la forme d'un mamelon opaque au milieu de la colonie. Cette partie centrale conserve des dimensions primitives alors que la colonie s'étend sur la gélose et peut atteindre 1mm. de diamètre. Ces colonies sont *incrustées* dans la gélose, le mamelon central ne fait pas saillie à la surface, et si on passe un fil de platine à la surface de ces colonies, on ne les détériore pas. M. Dujardin-Beaumont compare ces colonies aux clous appelés punaises, dont se servent les dessinateurs.

Quand, après avoir séché sur une lame une goutte de bouillon de culture de péricnemie, on la colore par une couleur basique d'aniline, on ne voit qu'un fin précipité et quelques particules albumineuses colorées, qu'on retrouve d'ailleurs dans une préparation faite avec une goutte de bouillon témoin. Ce précipité est dû, en grande partie, au sérum contenu dans le milieu nutritif. Pour éviter cet inconvénient il faut racler la surface de la gélose et faire une émulsion microbienne dans l'eau stérilisée. Des essais de coloration ont été faits avec le Ziehl à chaud. M. Dujardin-Beaumont, au lieu de colorer les émulsions microbiennes, a coloré en masse toute une colonie microbienne prise sur la gélose, en prélevant avec un rasoir à la surface de la gélose une mince tranche contenant les colonies qui y sont *incrustées*. En examinant ces diverses préparations à de forts grossissements on ne peut distinguer qu'une fine poussière colorée, composée d'éléments irréguliers formés par l'agglomération de microbes, mais il est impossible

de déterminer la forme d'un élément pris isolément.

Ainsi le microbe de la péripneumonie cultive sur bouillon peptonisé additionné de sérum, il cultive également sur milieu gélosé dans les conditions indiquées. Les températures extrêmes où peut se faire le développement de ce microbe sont, d'après M. Dujardin-Beaumetz, 42 et 30°. Le virus péripneumonique, soit dans la sérosité, soit en culture en bouillon sérum, est détruit à 58°. Le microbe de la péripneumonie se colore facilement par les colorants nucléaires et son invisibilité tient seulement à son extrême ténuité.

Enfin ce microbe passe à travers les bougies poreuses, et c'est ce que nous allons voir maintenant.

Dans les expériences de filtration faites après avoir obtenu la culture en bouillon de microbe péripneumonique, on constata que le filtrat de ce bouillon, placé à l'étuve, ne donnait rien. Ce n'est que lorsque apparut le travail de Loeffler sur la fièvre aphteuse, montrant l'importance de la dilution pour le passage à travers les bougies filtrantes, que les premiers résultats positifs furent obtenus.

La question en effet de la dilution et de la qualité des parois filtrantes est capitale pour obtenir des résultats positifs. « Lorsqu'on filtre un liquide albumineux, fait observer M. Dujardin-Beaumetz, la première partie de l'opération se fait bien, puis, la filtration se ralentit, et s'arrête ; l'albumine colmate la bougie et le liquide recueilli ne traverse plus la paroi filtrante que par dialyse. De là les insuccès des filtrations des cultures de

péricapnémie en bouillon sérum à 8 o/o. Pour que le microbe de la péricapnémie traverse les filtres, il ne faut pas que la quantité de sérosité présente dans le liquide dépasse 2 o/o ; au-delà de cette proportion les résultats sont inconstants. »

Le microbe de la péricapnémie traverse facilement la bougie Berkefeld, mais le filtrat contient souvent de fines particules terreuses qui gênent pour l'observation de la culture.

Le filtre employé pour la péricapnémie par M. Dujardin-Beaumetz est la bougie Chamberland F, qui est traversée facilement par le microbe et qui donne un filtrat limpide.

La bougie Chamberland B n'est pas traversée par le microbe de la péricapnémie, quelle que soit la dilution employée.

L'importance de la filtration, pour l'obtention de cultures pures de péricapnémie, est considérable. Elle dispense de précautions préalables, et la sérosité recueillie d'un bloc pulmonaire, même si elle a subi un commencement de putréfaction, permet d'obtenir par filtration, l'isolement du microbe péricapnémique.

Voici la technique employée par M. Dujardin-Beaumetz : La sérosité pulmonaire est diluée, dans la proportion de 1 à 2 parties pour 100, avec du bouillon préparé selon la méthode Martin, chauffé à 70°, et *non additionné de sérum*. Ce bouillon aura été précédemment filtré sur bougie Chamberland, dans le but de purifier le liquide de toutes les particules solides qui s'y trou-

vent en suspension et pourraient entraver la filtration d'isolement. Le mélange de sérosité et de bouillon est alors filtré sur bougie Berkefeld ou Chamberland F. Le liquide recueilli ainsi, ne contient pas assez de sérum pour la multiplication du microbe de la péripneumonie ; il suffit donc d'y ajouter du sérum, dans la proportion de 8 parties de sérum normal pour 100 parties de bouillon. Pour éviter les contaminations possibles on fait passer sur la bougie qui sert à l'isolement la quantité de sérum nécessaire (1).

Le bouillon obtenu ainsi est mis à l'étuve et trois ou quatre jours après il devient opalescent ; opalescence qui est l'indice de la culture du microbe de la péripneumonie. Cette opalescence se transmet par ensemencement sur bouillon sérum alors que le bouillon simple reste limpide.

Une goutte de ce bouillon opalin donne naissance, sur gélose sérum, à de très fines colonies, décrites antérieurement. Enfin l'inoculation reproduit l'infiltration de la péripneumonie.

MM. Borrel, Dujardin-Beaumetz, Jeantet et Jouan ont, en 1910, publié les résultats de l'examen ultra-microscopique du microbe de la péripneumonie.

« L'examen ultra-microscopique montre soit des points isolés, soit des diplocoques, soit des groupements de 3, 4, 5 individus manifestement englués dans

(1) Pour simplifier les manipulations M. Dujardin-Beaumetz recommande le filtre que le docteur Martin emploie pour faire les essais de toxine.

une gangue à peine visible ; les groupes de granulations ainsi visibles sont en même temps entraînés dans le liquide et chevauchent les uns sur les autres donnant l'impression de masses coulantes et visqueuses. Assez souvent à l'ultra-microscope, surtout dans les cultures de 4-5 jours etc., on constate des formes filamenteuses, des chaînettes d'individus ou de granulations dans une gaine peu apparente ; plus tard, ces filaments prennent un aspect fantôme, les granulations disparaissent, le filament est pâle et grêle ; des filaments ramifiés, des asters apparaissent ; dans la préparation observée assez longtemps les filaments se réunissent bout à bout et finissent par s'agglutiner ».

CLAVELÉE

Le virus de la clavelée ou variole ovine a fait l'objet d'une communication de M. Borrel à la Société de Biologie 1902. Cet auteur a étudié la filtration de ce virus. Voici ce que dit M. Borrel :

« Pour étudier le virus claveleux au point de vue de la filtration, j'ai surtout utilisé le raclage superficiel des pustules d'inoculation recueillis après la mort de l'animal et dilué dans une grande quantité d'eau ; les couches épidermiques d'une seule pustule peuvent être dissociées dans 100 centimètres cubes d'eau ; la suspension louche ainsi obtenue peut être étendue au millième et dans certaines expériences au dix-millième ; elle est encore virulente. Une expérience première de filtration sur Berkefeld donna un résultat positif, et le liquide, stérile dans le bouillon à 37° se montra virulent.

« Pour ces expériences j'ai utilisé des bougies Berkefeld et des bougies de porcelaine à débits variés. Pour les travaux de laboratoire M. Chamberland a mis à notre disposition des bougies de porosité variable (F², F³, F¹⁰), débitant deux, trois, quatre et jusqu'à dix fois plus que les bougies F employées pour la filtration ordinaire.

« Dans le cas d'une filtration *rapide, extemporanée*

sous pression de poire de caoutchouc, le virus claveleux passe quelquefois à la bougie Berkefeld, jamais à la bougie F, presque toujours aux bougies F¹, F⁴ etc... jusqu'aux bougies F¹⁰, dont le débit, toutes choses égales, est dix fois supérieur à celui de la bougie F ordinaire. Dans toutes ces filtrations, le liquide ensemencé en bouillon à 37° reste stérile, et pourtant si la dilution a été faite avec de l'eau de conduite, la filtration laisse passer des microbes particulièrement petits, mobiles, surtout des vibrions, qui paraissent et se cultivent très bien dans le liquide filtré lui-même simplement conservé à 20 degrés. Le passage de ces vibrions peut dans ces conditions d'expérience, servir de test pour le passage du virus.

« Pour avoir le virus claveleux débarrassé de tous les microbes d'impureté, il suffit de faire les dilutions avec de l'eau bouillie ; le liquide filtré, stérile dans toutes les conditions de culture jusqu'ici réalisées, reste virulent pendant longtemps.

« Dans ces cas de filtration rapide, extemporanée, jamais le virus ni les vibrions des eaux ne passent à la bougie F.

« Il en est tout autrement si, sur la bougie F, on filtre d'une façon continue de un à sept jours : tout d'abord rien ne passe, mais le quatrième ou le cinquième jour des microbes d'impureté, mobiles toujours, et d'abord les vibrions de l'eau, traversent le filtre, le liquide devient virulent.

« Ces études sur la filtration des virus sont à pour-

suivre, conclut M. Borrel ; d'abord elles nous fournissent un moyen commode d'obtenir du virus claveleux pur, et elles paraissent démontrer que les formations intra-cellulaires décrites comme parasites dans la vaccine, la variole, la clavelée, ne sauraient être considérées comme parasites ; elles orientent les recherches du côté des microbes analogues à ceux de la péripneumonie ou de la fièvre aphleuse. »

MOLLUSCUM DES OISEAUX. — PESTE DES OISEAUX. — HORSE-SICKNESS. — PESTE BOVINE. — VIRUS MYXONATEUX. — PESTE AVIAIRE. — EPITHELIOMA CONTAGIOSUM DES POULES. — AGLASSIE CONTAGIEUSE DES BREBIS ET DES CHÈVRES LAITIÈRES. — SEPTICÉMIE DES MERLES. — FIÈVRE CATARRHALE DU MOUTON. — ANÉMIE PERNICIEUSE DU CHEVAL. — MALADIE DES JEUNES CHIENS. — “ MOSAÏQUE ” DU TABAC.

En dehors des deux maladies précédentes, il existe, chez les animaux, toute une série d'affections qui sont causées par des germes « invisibles ». Le règne végétal lui-même ne semble pas être épargné par ces microbes, comme le prouve la « Mosaïque du tabac ».

Nous résumerons les connaissances acquises sur les microbes de ces diverses maladies en les empruntant aux études de M. Roux en 1903 et de M. Remlinger en 1906.

Molluscum des oiseaux. — MM. E. Marx et Anton Sticker triturèrent, avec de l'eau, une de ces tumeurs que les pigeons et les poules ont parfois autour du bec et qui caractérisent le molluscum des oiseaux ; le suc inoculé provoque l'apparition de tumeurs après une incubation de 5 à 6 jours. Le liquide, provenant du broyage d'une tumeur dans l'eau physiologique, filtré sur une bougie Berkefeld, est virulent. Le virus passe donc à travers le filtre silicieux, mais il est arrêté par la bougie Chamberland F. « Le molluscum, ajoute en terminant M. Roux, étant constitué par une prolifération de l'épithélium, est parent des tumeurs cancéreuses et il est fort important de savoir que le virus qui le cause est de ceux qu'on ne voit pas. »

Peste des oiseaux. — La peste des oiseaux, ainsi appelée par M. Centanni, est une affection surtout fréquente en Italie. Les oiseaux atteints refusent la nourriture, se tiennent dans un coin, somnolents et indifférents. Leur crête devient violacée. La mort survient du troisième au huitième jour, avec abaissement de la température au-dessous de 30° dans les derniers moments. Le sang et la pulpe des organes sont très virulentes. La recherche d'un microbe au moyen des colorations et des cultures est restée infructueuse ; les expérimentateurs ont filtré du sang et de la pulpe d'organes, déliés dans

de l'eau physiologique et additionné du contenu intestinal de poule, riches en microbes. La bougie Berkefeld et la bougie Chamberland F arrêtaient bien les microbes ajoutés, mais laissèrent passer le virus de la peste des oiseaux ; en effet, le filtrat ne donnait pas de culture, mais il tuait les poules auxquelles on l'inoculait.

Horsesickness. — La Horsesickness est une affection qui sévit en Afrique du Sud sur les chevaux récemment importés. Elle se traduit surtout par des troubles respiratoires avec jetage mousseux et rosé, et de la fièvre. L'animal meurt très rapidement après l'apparition des troubles respiratoires. Cette maladie est inoculable mais ne se transmet pas par simple contact d'un animal malade à un animal sain. Le sang, la sérosité contiennent le virus ; ils ne donnent pas de culture, on n'y voit aucune forme microbienne. Nocard a constaté que la sérosité étendue de trente-trois son volume d'eau de Seine et filtrée sur bougie Berkefeld ne cultivait pas et était virulente, tandis qu'elle était inoffensive après son passage à travers une bougie Chamberland, marque F. M. Mac-Fadyan a filtré la sérosité non diluée et du sang mélangé de sérum sur bougie Berkefeld et même sur une bougie Chamberland F, il a recueilli un filtrat actif. D'après le même auteur, la bougie Chamberland, marque B, ne laisse passer le virus que si la sérosité a été étendue de trente fois son volume d'eau. Aussi M. Mac-Fadyan pense-t-il que le microbe de la horse-sickness est plus petit que ceux de la péripneumonie et de la fièvre aphteuse qui sont retenus par la bougie Chamberland, marque B.

Peste bovine. — La peste bovine qui a sévi dans l'Afrique du Sud en 1895, est causée par un virus abondant dans toutes les humeurs et tous les organes, et ce virus est incultivable et invisible. MM. Nicolle et Adil-Bey qui ont observé la peste bovine en Turquie ont montré que le virus est très petit et passe à travers les filtres. Pour réussir l'expérience, il faut employer une sérosité suffisamment diluée, une bougie dont les pores ne soient pas trop serrés et dont les parois ne soient pas trop épaisses. MM. Nicolle et Adil-Bey ont eu l'idée ingénieuse de diminuer l'épaisseur des bougies Berkefeld en les usant régulièrement, ils obtiennent ainsi des filtres seliceux de perméabilité graduée capables cependant de retenir encore les bactéries ordinaires. Le liquide à filtrer est additionné de culture très virulente de choléra des poules qui sert de test ; le filtrat inoculé aux poules et aux lapins ne doit leur causer aucun mal. L'eau de conduite du laboratoire riche en bactéries variées servait à diluer les sérosités et constituait un test excellent à cause des vibrions qu'elle contient. Le filtrat est ensemencé dans des ballons de bouillon, conservés plusieurs jours à 37° et à 22° qui est la température optima pour le développement des vibrions de l'eau. Lorsqu'il n'y a pas de culture l'expérience est faite dans de bonnes conditions. MM. Nicolle et Adil-Bey ont vu le virus pestique passer à travers les bougies Berkefeld normalement, tantôt assez abondamment pour donner la maladie mortelle, tantôt en quantité trop petite pour tuer, mais suffisante pour immuniser.

Le filtrat fourni par les bougies Berkefeld amincies tuait presque toujours les bœufs qui le recevaient.

La bougie Chamberland F arrête le virus ou n'en laisse traverser que très peu. MM. Nicolle et Adil-Bey pensent que le virus pestique est intra-leucocytaire et qu'il ne filtre que lorsqu'il est dégagé des débris cellulaires.

Virus myxomateux. — C'est une affection décrite observée à Montévidéo, sur les lapins de l'Institut hygiénique. La sécrétion des conjonctives, l'œdème des paupières et de la peau, le sang et la pulpe des organes sont virulents. Une trace de ces produits injectée sous la peau ou dans les veines, déposée sur la conjonctive ou encore ingérée donne la maladie. Les tumeurs sont formées par un tissu myxomateux avec éléments étoilés et capillaires sanguins dilatés. Nulle part on ne peut trouver de microbe, soit par l'examen microscopique soit par la culture. M. Sanarelli appelle le virus de cette maladie virus myxomateux à cause des lésions qu'il détermine et il conclut que le microbe qui le constitue est trop petit pour être vu. Il ne dit pas si le virus traverse les filtres.

La *Peste aviaire*, séparée du choléra des poules en 1901 par Centanni et Savonuzzi et rattachée aux microbes invisibles par eux d'abord, par Maggiora et Valenti ensuite, est beaucoup plus répandue qu'il ne semblait tout d'abord. Elle s'étend à tous les oiseaux de basse-cour et fait en particulier de grands ravages parmi les faisans. L'oie et le pigeon moins réceptifs

peuvent être infectés néanmoins. Calamida a vu que les bougies Chamberland F et même B laissaient passer ce virus qu'on savait traverser le Berkefeld avec la plus grande facilité.

Les travaux de Marx et Sticker sur la filtrabilité du virus de l'*épithélioma contagiosum* des poules ont été confirmés par ceux de Julinsberg. Le liquide filtré à travers la bougie de Berkefeld reproduit la maladie chez la poule après une incubation de 6 à 7 jours (incubation avec le liquide non filtrée 3 ou 4 jours). Les bougies Chamberland sont par contre imperméables. Les pigeons inoculés avec le filtrat Berkefeld, contractent l'épithéliome après 14 jours d'incubation. Cette période est triple de celle qu'on observe avec le virus non filtré.

L'aylassie contagieuse des brebis et des chèvres lactières est une affection fréquente en Italie, particulièrement dans la campagne romaine. Elle se traduit par des arthrites surtout radio-carpiennes et par des kératites qui peuvent aboutir à la panophtalmie et à la cécité et par une altération très spéciale du lait. Il est très réduit en quantité et se présente tantôt sous forme de crème épaisse, tantôt sous un aspect aqueux. La maladie est très contagieuse. Elle est transmissible expérimentalement par l'inoculation du lait des brebis malades. Ce lait ne renferme aucun microbe visible capable de reproduire la maladie. Celli et Blasi ont dès lors eu l'idée qu'il pouvait s'agir d'un organisme ultra-microscopique. De fait, le lait filtré, (les auteurs ne disent

pas à travers quelle bougie) ne montre aucun germe ni à la culture, ni au microscope, et son inoculation reproduit la maladie avec toutes ses caractéristiques.

Maggiora et Valenti ont étudié une épidémie sévissant sur les merles, ressemblant à une *scepticémie*. Le sang, le foie, la rate étaient virulents, mais ni l'examen microscopique, ni les cultures ne décelaient la présence des microbes visibles. Le suc des divers organes d'un merle ayant succombé à la maladie furent, ainsi que le sang du cœur, dilués dans une solution physiologique de NaCl et filtrés à travers une bougie Berkefeld. Le filtrat (stérile à la culture) permet de reproduire la maladie avec la plus grande facilité.

La fièvre catarrhale du mouton est une maladie des possessions anglaises du Sud de l'Afrique, elle est caractérisée par de la fièvre, des lésions de la bouche (rougeur, œdème des lèvres et de la langue); un écoulement nasal et des ulcérations au pied. L'examen microscopique et les cultures ne révèlent pas dans le sang des animaux atteints le moindre microbe visible et Theiler avait de longue date considéré la maladie comme causée par un organisme ultra-microscopique. Il en a donné la démonstration conjointement avec Robertson. Le sang passé à travers une bougie Berkefeld a donné un filtrat virulent.

De même pour le sérum. Le microbe invisible n'est donc pas endoglobulaire. Le sang desséché perd rapidement sa virulence, mais à l'état liquide il la conserve très longtemps.

L'anémie pernicieuse du cheval est une affection assez fréquente dans l'est de la France, la vallée de la Meuse notamment, en Alsace-Lorraine et aussi en Normandie. Elle se traduit par des signes d'anémie grave, progressive; de l'élévation de la température, de l'albuminurie, des troubles cardiaques et locomoteurs. Elle se termine d'ordinaire par la mort du sujet. Elle est contagieuse, inoculable, mais les recherches bactériologiques n'aboutissent qu'à l'isolement d'espèces banales, sans caractère spécifique. Carré et Vallée filtrent sur une bougie de fabrication spéciale, un peu plus poreuse que la bougie Berkefeld V, un mélange de 500 cm^3 de sérum d'un malade et de 2000 cm^3 d'une solution en sérum physiologique d'une culture très riche de pasteurellose ovine extrêmement virulente. Le filtrat est inoffensif pour le lapin et le cobaye, mais un cheval inoculé dans la jugulaire avec 500 cm^3 , c'est-à-dire avec 100 cm^3 de sérum, présente après 6 jours d'incubation tous les signes d'une anémie à marche rapide absolument caractéristique. Les bougies Chamberland F et B laissent également passer le virus mais l'incubation se montre plus longue.

Carré a étudié la *maladie des jeunes chiens* au point de vue bactériologique. La « filtration sur bougie très poreuse » du jetage dilué dans de l'eau stérilisée fournit un liquide qui largement ensemencé en différents milieux se montre stérile, et qui, inoculé à de jeunes chiens provoque cependant l'évolution de troubles morbides de tous points semblables à ceux de la maladie. Si on ino-

cule à un animal neuf du sang défibriné d'un animal infecté par le filtrat, cet animal a de la fièvre, du coryza, des pustules. Largement ensemencé en différents milieux ce même sang ne donne aucune culture.

Enfin le *Hog-choléra* serait également causé un virus « invisible ». C'est ce qui ressort des travaux de Dorset, Bolton et Bryde, confirmés par ceux de Ceintock, Boxemeyer et Siffer. Du sang de porcs ayant succombé à un hog-choléra typiqué est filtré à travers une bougie Berkefeld.

Inoculé à des lapins et à des cobayes, ce filtrat demeure sans effet. Injecté au contraire sous la peau des porcs, il les tue, comme l'infection naturelle, en 19-38 jours. Les lésions anatomiques constatées à l'autopsie sont celles d'un hog-choléra typique et la maladie peut être reproduite en série en partant du sang. Les auteurs rapprochent la pneumo-entérite du porc de la peste bovine et croient qu'elle est causée comme celle-ci par un organisme ultra-microscopique.

Mosaïque du tabac. — M. Beijerinck, en 1898, a attiré l'attention sur un virus qui se trouve dans le suc des feuilles de tabac atteintes de la maladie appelée « mosaïque ». Avec le suc de ces feuilles on peut infecter des feuilles saines. Filtré sur bougie de porcelaine, ce suc détermine la maladie comme avant la filtration. Ce suc ne donne point de culture. « La conclusion à tirer, dit M. Roux, des expériences de M. Beijerinck est que la « mosaïque » doit être causée par un microbe très ténu, non visible au microscope, et passant à travers les filtres ».

CONCLUSIONS

Il existe chez l'homme et chez les animaux un certain nombre de maladies causées par des germes invisibles au microscope et passant à travers les bougies filtrantes retenant les microbes connus.

Ces maladies sont aujourd'hui au nombre d'une vingtaine environ. On peut les diviser en deux groupes :

a) Maladies spéciales à l'homme, ou communes à l'homme et aux animaux : Fièvre jaune, Dengue, Rougeole, Fièvre à Papatacï, Variole, Scarlatine (1), Coqueluche, Oreillons, Vaccine, Rage, Fièvre aphteuse.

b) Maladies spéciales aux animaux et aux végétaux : Péricnemonie, Clavelée, Peste des Oiseaux, Molluscum des Oiseaux, Peste bovine, Horse-Sickness, Virus myxomateux, Peste aviaire, Aglassie contagieuse des brebis et des chèvres laitières, Fièvre catarrhale du

(1) Il est encore impossible de se prononcer définitivement pour la scarlatine. Néanmoins M. Bernhardt a réussi deux fois sur quatre à inoculer la scarlatine à des singes avec le filtrat de produits scarlatineux. La filtration avait été effectuée sur filtre Berkefeld. Au microscope on n'a découvert aucun microbe dans le filtrat.

mouton, Anémie pernicieuse du cheval, Maladie des jeunes chiens, « Mosaïque » du tabac.

— Les germes de ces maladies sont *invisibles* au microscope (1) avec les plus forts grossissements, et également invisibles avec l'ultra-microscope. « Les dimensions de ces microbes, dit M. Roux, sont voisines de celles des longueurs d'onde de la lumière, pour les rendre distincts il faudrait employer des radiations plus courtes et elles ne seraient pas perçues par notre œil.

Ces microbes *passent à travers les filtres* (Chamberland F et B, Berkefeld N, V, W, Kilasato etc...), retenant les microbes connus. La filtration de ces microbes invisibles à travers les bougies filtrantes est soumise à certaines règles, que nous résumerons ainsi :

a) Il conviendrait de ne se servir que de bougies fabriquées spécialement pour la filtration de ces microbes ; elles auraient une notation minutieusement établie d'après le débit fourni pour une pression déterminée pendant l'unité de temps.

b) La bougie employée ne doit pas être trop serrée, mais à la limite de la perméabilité pour un test microbien convenable.

c) Comme test microbien il vaut mieux choisir un microbe mobile qu'un microbe immobile.

(1) Exception faite pour la péripleumonie qui est à la limite de la visibilité, — et pour la coqueluche et les oreillons, dont les germes ne seraient pas invisibles au microscope et passeraient cependant à travers les filtres d'après les expériences de Casagrandi pour la coqueluche et de Saverio Granata pour les oreillons. Il convient d'ailleurs, pour ces deux dernières affections, d'attendre le résultat de nouvelles expériences.

- d) Le liquide à filtrer doit être très dilué.
- e) La filtration doit être rapide, extemporanée.
- f) Il est préférable de ne prendre que les premières gouttes du liquide filtré.
- g) La filtration doit s'effectuer sous une faible pression. Une aspiration de 50 à 500 ^{mm} de hg. obtenue avec une trompe à eau est suffisante.
- h) Les opérations doivent être faites à la température ambiante.
- i) Il importe de se méfier du colmatage de la bougie par les matières albuminoïdes.

Les germes de ces maladies sont des *microbes* et non des *toxines*, c'est l'opinion des auteurs qui les ont étudiées, et M. Chauveau a donné les preuves physiques de l'existence de ces microbes par ses expériences de « dilutions progressives » et de « diffusion ».

En dehors du fait qu'ils sont *invisibles*, ces microbes sont presque tous jusqu'à présent *incultivables* (1).

Ils présentent une *faible résistance* aux agents d'atténuation, à la chaleur en particulier. Le microbe de la fièvre jaune est détruit en 10 minutes à 55°, celui de la rougeole en 15 minutes à 55°, celui de la rage en 10 minutes à 47°, 48° etc. . .

Ces microbes sont très vraisemblablement des microbes *mobiles*. C'est l'opinion de M. Roux qui écrivait il y a quelques années. « Il est donc à supposer que les

(1) Exception faite pour le microbe de la péripneumonie, à la limite de la visibilité, et qui a été cultivé sur milieu spécial.

virus dit invisibles, traversant les filtres, sont *doués de mobilité*, et c'est pour cela qu'ils passent, alors que des granulations inertes, aussi petites qu'eux sont arrêtées ».

Ces microbes déterminent des lésions anatomo-pathologiques analogues caractérisées surtout par « la prolifération des épithéliums et la formation de pustules ou même de petites tumeurs épithéliales » (Borrel).

Vu : le Président de Thèse,
ACHARD.

Vu : Le Doyen,
LANDOUZY.

Vu et permis d'imprimer,
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.
LIARD.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON et GOLDBERGER. — « The nature of virus of measles. *Journal of the American Med association.* — « Expérimental measles in the monkey ». *Public Health Rep.* June 16, 1911.
- ASHBURN et GRAIG. — « Dengue » *Philippine Journal of sciences*, 1907. Vol. 2. Section medical sciences.
— *Journal of Tropical medecine* 1906.
- BORREL. — Comptes-rendus de la Société de Biologie, 1902 et 1904. « Sur la filtration du virus claveléux ».
- CASAGRANDE. — « Sulla etiologia della tosse convulsa ». *Policlinico Roma*, 1906, XIII. Sezione pratica.
— « Sulla filtrabilità del virus vaiuoloso umano et sui rapporti tra questo virus e quello bovino. » *Policlinico Roma*, 1908, XV. Sezione pratica.
- A. CHAUVEAU. — « Les microbes pathogènes invisibles et les preuves physiques de leur existence ». Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1909.
- DUJARDIN-BEAUMETZ. — « Le microbe de la péripneumonie ». Thèse Paris, 1900.
- GRAIG. — « Papataci Fever ». *New-York Méd. Journal*-25 février 1911.

GUINOCHET. — « Sur la filtration des eaux ». Thèse
Paris 1894.

LEVADITI. — « Les travaux récents sur l'étiologie de la
scarlatine ». *Presse Médicale*, 1912.

LOEFFER. — « Sur la fièvre aphteuse ». *Deutsche Med
Wochenschrift*, 1898, n° 35.

E. MARCHOUX. — « Bougies filtrantes et virus invisibles ». *C. R. Société de Biologie*, t. LVX, 1908.

REMLINGER. — « Sur la filtration du virus rabique ». *Annales de l'Institut Pasteur* 1903 et 1904.

— « Sur les microbes filtrants ». *Bulletin de l'Institut Pasteur*, Paris 1906.

ROUX. — « Sur les microbes filtrants ». *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1903.

SAVERIO GRANATA. — « Sull' Etiologia degli orecchioni da virus filtrabile ». *Med. Ital. Napoli*, 1908, VI.

WALTER REED et CAROLL. — « Yellow Fever ». *Journal of tropical Medicine*, 1902.

— *Philippine Med. Journal*, 1900, 27 octobre.

— *New-York Medical Journal*, 1911.

